

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie – Campus Benjamin Franklin der
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifizierung und Charakterisierung exogener und endogener endothelialer Fakto-
ren für die Ätiopathogenese der Atherosklerose

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Markus Tölle

aus Herne

Gutachter:

- 1) Prof. Dr. med. Markus van der Giet
- 2) Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Hörl
- 3) Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Datum der Promotion: 25.04.2006

Aus tiefstem Herzen

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis:

1. Aufzählung der für diese Publikationspromotion verwendeten Originalarbeiten	1
2. Zusammenfassung	2
3. Einleitung und Fragestellung	4
4. Methoden	7
5. Ergebnisse und Diskussion	11
Anhang 1: Lebenslauf	20
Anhang 2: Publikationsverzeichnis, Abstracts, Vorträge, Förderungen	21
Anhang 3: Abbildungen	26
Anhang 4: Literaturverzeichnis	41

Abbildung 1: HDL induzierte Vasorelaxation an einer isolierten thorakalen Aorta.....	26
Abbildung 2: HDL induziert NO-Produktion in HUVECs	26
Abbildung 3: DWK der HDL induzierten Vasorelaxation an thorakalen Aortenringen.....	27
Abbildung 4: Immunhistologische Darstellung der phosphorylierten eNOS	27
Abbildung 5: In vivo Effekt von HDL auf den systemischen Blutdruck einer WKY-Ratte	28
Abbildung 6: Western Blot Analyse der HDL induzierten AKT und eNOS Phosphorylierung...	28
Abbildung 7: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der AKT-Kinase und eNOS	29
Abbildung 8: Geschlechterspezifische Unterschiede der HDL-induzierten Vasorelaxation	29
Abbildung 9: DWK der LPL induzierten Vasorelaxation an thorakalen Aortenringen.....	30
Abbildung 10: Wirkung der LPL an thorakalen Aorten von eNOS defizienten Mäusen	30
Abbildung 11: In vivo Effekt der LPL auf den systemischen Blutdruck einer WKY-Ratte	31
Abbildung 12: LPL induziert NO-Produktion in HUVECs	31
Abbildung 13: Western Blot Analyse der LPL induzierten AKT und eNOS Phosphorylierung...	32
Abbildung 14: Wirkung von LPL auf thorakale Aorten von S1P3 defizienten Mäusen	32
Abbildung 15: HDL und LPL induzierte AKT Phosphorylierung in S1P3 defizienten MHEC...	33
Abbildung 16: Wirkung von FTY720 auf thorakale Aorten von C57Bl/6 Mäusen.....	33
Abbildung 17: Wirkung von FTY720-P auf thorakale Aorten von C57Bl/6 Mäusen	34
Abbildung 18: DWK von FTY720 und FTY720-P an thorakalen Aorten von C57Bl/6 Mäusen	34
Abbildung 19: Wirkung von FTY720 unter Inhibition der eNOS durch L-NAME	35
Abbildung 20: Wirkung von FTY720 an thorakalen Aorten von eNOS defizienten Mäusen.....	35
Abbildung 21: FTY720 und FTY720-P induzierte NO-Produktion in HUVECs.....	36
Abbildung 22: Bedeutung der Sphingosin-Kinase für die FTY720 induzierte NO Produktion ...	36
Abbildung 23: DWK der FTY720 Analoga AAL149, AAL151 und AFD298	37
Abbildung 24: DWK von FTY720-P an thorakalen Aorten von S1P3 +/+ und -/- Mäusen.....	37
Abbildung 25: Wirkung von Endothelzellüberständen auf den renalen Perfusionsanstieg	38
Abbildung 26: Inhibition der Vasoaktivität des EZÜ auf den renalen Perfusionsdruck.....	38
Abbildung 27: DWK von Up4A auf den renalen Perfusionsdruck.....	39
Abbildung 28: Bedeutung von P2X-Rezeptoren.....	39
Abbildung 29: In vivo Effekt der systemischen Applikation von Up4A auf den MAD.....	40

1. Aufzählung der für diese Publikationspromotion verwendeten Originalarbeiten

- (1) Nofer JR, van der Giet M, **Tölle M**, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schäfers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P₃.

J Clin Invest. 2004 Feb;113(4):569-81.

Auflistung des für diese Arbeit erbrachten Methodenspektrums:

Physiologische Experimente am Kleingefäßmyographen, Intraarterielle Blutdruckmessung, Western Blot Analysen, Immunhistochemie, Zellkultur, Fluoreszenzmikroskopie (insgesamte Beteiligung: 35 %)

- (2) Jankowski V*, **Tölle M***, Vanhoulde R, Schönfelder G, van der Giet M, Henning L, Paul M, Schlüter H, Zidek W, Jankowski J.

Identification of uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) as an endothelial-derived vasoconstrictive factor.

Nat Med. 2005 Feb;11(2):223-7.

* Diese Autoren sind gleichberechtigt an der Erstellung der Arbeit beteiligt

Auflistung des für diese Arbeit erbrachten Methodenspektrums:

Isoliert perfundierte Rattenniere, intraarterielle Blutdruckmessung.

(insgesamte Beteiligung: 33 %)

- (3) **Tölle M***, Levkau B*, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schönfelder G, Schäfers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, van der Giet M.

The immunomodulator FTY720 induces eNOS-dependent arterial vasodilation via the lysophospholipid receptor S1P₃.

Circ Res. 2005 Apr 29;96(8):913-20.

* Diese Autoren sind gleichberechtigt an der Erstellung der Arbeit beteiligt

Auflistung des für diese Arbeit erbrachten Methodenspektrums:

Physiologische Experimente am Kleingefäßmyographen, Western Blot Analysen, Zellkultur, Fluoreszenzmikroskopie

(insgesamte Beteiligung: 50 %)

2. Zusammenfassung

Hintergrund:

Innerhalb der physiologischen Regulation des Gefäßradius und der Morphologie der Gefäßwand ist das Endothel vielfältig involviert. Eine wichtige physiologische Aufgabe des Gefäßendothels ist die Regulation des Gefäßtonus. Auf das Gefäß relaxierend wirkende Moleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin I₂ (Prostacyclin), werden hauptsächlich aus dem Endothel freigesetzt. Die Bedeutung des Endothels für die Freisetzung von vasokonstriktorisch wirkenden Molekülen ist dagegen wesentlich weniger belegt. Funktionsstörungen des Endothels spielen eine wichtige Rolle innerhalb der Pathogenese von Hypertonie und Atherosklerose, zweier Volkskrankheiten mit großer gesundheitspolitischer Bedeutung. Aus epidemiologischen Studien ist bereits lange bekannt, dass eine Verminderung des „High Density Lipoprotein“ (HDL)-Plasmaspiegels ein eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist. Die physiologischen und pathophysiologischen Einflüsse von HDL auf die Gefäßregulation sind bis heute lediglich unzureichend untersucht.

Zielsetzungen:

Der erste und zweite Teilabschnitt dieser Publikationspromotion soll sich mit der Bedeutung der HDL-Moleküle und der assoziierten Lysophospholipide (LPL) Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und Lysosulfatid (LSF) und dem Lysophospholipid-basierten Immunmodulator FTY720 auf die endotheliale Funktion beschäftigen. Dabei soll auf die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch die vorgenannten Faktoren eingegangen werden. Im dritten Teilabschnitt soll auf die pharmakologische Charakterisierung eines neuartig entdeckten endothelialen vasoaktiven Faktors, Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (Up4A), eingegangen werden.

Methoden:

Um den Einfluss von HDL und den LPL S1P, SPC, LSF und FTY720 auf die endotheliale Funktion zu untersuchen, wurden physiologische Experimente an isolierten Aortenringen an einem Kleingefäßmyographen durchgeführt. Durch Western Blot Untersuchungen wurden die Signaltransduktionswege untersucht. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse wurde die direkte Freisetzung von NO aus humanen Endothelzellen visualisiert. In immunhistologischen Untersuchungen wurde die phosphorylierte Form der eNOS in der Endothelschicht aus Aortenringquerschnitten nachgewiesen. Die Wirkung von HDL, LPL und FTY720 auf den systemischen mittleren Blutdruck (MAD) einer Wistar-Ratte wurde durch intraarterielle Applikation dieser Substanzen unter kontinuierlicher Aufzeichnung des intraarteriellen MAD gemessen. Die physiologische Charakterisierung von Up4A wurde an der isoliert perfundierten Rattenniere durchgeführt. Schließlich wurde der Einfluss der intraaortalen Applikation von Up4A auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck von Wistar-Ratten untersucht.

Ergebnisse:

HDL-Moleküle und die assoziierten LPL aktivieren die eNOS konzentrations- und zeitabhängig und induzieren an isolierten vorkontrahierten Aortenringen eine signifikante endothelabhängige Vasodilatation.

Dabei induzieren HDL-Moleküle 50% der beobachteten Vasodilatation über die Aktivierung des spezifischen LPL-Rezeptors S1P₃-Rezeptors. Die assoziierten LPL verursachten eine Vasodilatation, die ausschließlich über einen S1P₃ Rezeptor vermittelt wird. In diesen Signaltransduktionsprozess ist die Phosphorylierung der AKT-Kinase eingeschlossen. Die aktivierte AKT-Kinase phosphoryliert die eNOS. Der neuartige Immunmodulator FTY720, ein strukturelles Homolog des HDL assoziierten LPL S1P, aktiviert ebenfalls über den S1P₃ Rezeptor die AKT-Kinase mit einer anschließenden Phosphorylierung der eNOS in einem zeit- und konzentrationsabhängigen Signaltransduktionsprozess. Der aus dem Überstand von Endothelzellen isolierte endothelständige vasoaktive Faktor Up4A ist im Nierengefäßsystem ein sehr potenter Vasokonstriktor. Die im humanen Plasma nachgewiesenen Konzentrationen bewirken eine lang anhaltende Erhöhung des intraarteriell gemessenen Blutdrucks einer WKY-Ratte nach intraaortaler Applikation. Up4A, als ein aus einem Purin und einem Pyrimidin aufgebautes gemischtes Dinukleosidpolyphosphat, besitzt Affinitäten sowohl zu den P2X- als und zu den P2Y-Rezeptoren und vermittelt vaso-konstriktive und vasodilative Veränderungen.

Konklusion:

Diese 3 Teilprojekte ergeben zusammenfassend näheren Aufschluss über wichtige Regulationsmechanismen, über die das Endothel die Funktion von Gefäßen beeinflusst. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein direkter Rezeptor-vermittelter antiatherosklerotischer Mechanismus von HDL-Molekülen nachgewiesen werden. Außerdem konnten die diesen Effekt vermittelnden HDL-Komponenten, die Lysophospholipide, und der beteiligte Rezeptor, der S1P₃-Rezeptor, identifiziert werden. Im zweiten Abschnitt dieser Publikationspromotion konnte die mögliche Bedeutung der Lysophospholipide in der therapeutischen Anwendung weiter charakterisiert werden. Der Lysophospholipid-basierte Immunmodulator FTY720, als S1P-Analogon ein starker S1P₃-Rezeptor Agonist, ist ebenfalls ein potenter eNOS Aktivator, der wie S1P die gleichen Signaltransduktionswege induzieren kann. Im dritten Teil dieser Publikationspromotion konnte eine andere Funktion des Endothels, die der Sekretion von potenten Vasokonstriktoren, nachgewiesen werden. Zum ersten Mal konnte das gemischte Dinukleosidpolyphosphate Up4A aus dem Überstand von Endothelzellen isoliert und charakterisiert werden, welches über die Aktivierung verschiedener Purinrezeptoren eine direkte Wirkung auf den renalen Perfusionsdruck und systemischen Blutdruck besitzt.

3. Einleitung und Fragestellung

Innerhalb der physiologischen Regulation des Gefäßradius und der Morphologie der Gefäßwand spielt das Endothel mit seinen Einflüssen eine wichtige Rolle. Die physiologischen Aufgaben des Endothels sind unter anderem die Bildung einer antithrombogenen Oberfläche[1], die Kontrolle des trans- und perizellulären Stofftransportes und die Produktion von Mediatoren, die die Gefäßstruktur, den Gefäßtonus, die Koagulation, die Fibrinolyse und die Entzündungsreaktion steuern[2]. Eine schwerwiegende Veränderung der normalen Endothelfunktion, die auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird, ist eine der wichtigsten pathophysiologischen Faktoren für die Genese von Hypertonie und Atherosklerose[3]. Diese Volkskrankheiten bilden die Grundlage für die zahlreichen kardiovaskulären Ereignisse, wie z.B. Myokardinfarkte oder zerebrale Insulte. Neben diesen Risikofaktoren treten Veränderungen des Plasmalipidprofils zunehmend in den Fokus. Seit einer langen Zeit ist aus epidemiologischen Studie bekannt, dass die Verminderung der HDL-Plasmakonzentration einen eigenständigen Risikofaktor für die gesteigerte Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen darstellt[4, 5, 6]. Dabei wurde über einen Zeitraum von mehr als 40 Jahren den HDL-Molekülen eine antiatherogene Wirkungen durch deren Fähigkeit zum reversen Cholesterintransport und der damit verbundenen Verminderung der Cholesterinkonzentration zugesprochen[7]. 2001 konnte die Arbeitsgruppe um Yuhanna zeigen, dass HDL-Moleküle zu einer direkten Aktivierung der eNOS führen[8]. Die HDL-Moleküle sind jedoch sehr komplex strukturierte Moleküle und die Bedeutung der einzelnen HDL-Komponenten auf die eNOS Aktivierung konnte nicht geklärt werden. 2003 wurden von der Arbeitsgruppe um Gong die HDL-assoziierten Östrogene für die eNOS Aktivierung verantwortlich gemacht, wobei nur isoliertes HDL aus dem Plasma von weiblichen Probanden eNOS aktivierende Eigenschaften besitzen sollte[9]. Da kardiovaskuläre Erkrankungen heutzutage weiterhin an der Spitze der Todesursachen liegen[3], ist neben der Behandlung der klassischen Risikofaktoren eine wesentliche Aufgabe, protektive Faktoren zu finden, durch die ein Ansatz zur Senkung der kardiovaskulären Morbidität und der sich daraus ergebenden Mortalität ergibt. Aus diesen Gründen ergeben sich die Zielstellungen für den ersten Teil dieser Publikationspromotion:

- (1) Welche Komponenten der komplex aufgebauten HDL-Moleküle sind für die Aktivierung der eNOS verantwortlich?
- (2) Über welchen Rezeptor wird die eNOS Aktivierung ggf. vermittelt?
- (3) Welcher Signaltransduktionsweg ist in die eNOS Aktivierung ggf. eingeschaltet?
- (4) Gibt es signifikante Unterschiede zwischen weiblichem und männlichem HDL?

Die auf Glycerol oder auf Sphingosin basierenden Phospholipide sind unabkömmliche strukturelle Komponenten von Zellmembranen. Diese Komponenten werden in verschiedene polare Metaboliten verstoffwechselt, wie beispielsweise Eicosanoide oder LPL[10]. Die letzteren Moleküle beinhalten u.a. S1P, SPC, LSF und darüber hinaus Lysophosphatidsäure (LPA) und Lysophosphatidylcholin (LPC). In früheren Zeiten wurden die LPLs lediglich als intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle betrachtet[11]. Die

Ansicht hat sich nach der Entdeckung von durch LPL aktivierte Plasmamembranrezeptoren gewandelt, so dass zunehmend Effekte von LPL erkannt werden, die über extrazelluläre rezeptorgesteuerte Mechanismen vermittelt werden[12]. S1P ist der Hauptvertreter einer der beiden großen Untergruppen von LPL. Es sind derzeit fünf spezifische S1P-Rezeptoren bekannt (S1P₁-S1P₅ Rezeptor) bekannt[13]. LPL haben u.a. Wirkungen auf das kardiovaskuläre System und insbesondere auf das Immunsystem[14, 15]. Ein strukturelles Homolog des S1P ist der Immunmodulator FTY720[16]. Die Aktivierung des S1P₁-Rezeptors durch FTY720 bewirkt eine irreversible Internalisierung dieses Rezeptors. Die Aktivierung dieses Rezeptors ist jedoch von entscheidender Bedeutung in der Rekrutierung von Lymphozyten aus den Lymphorganen in die zirkulierende Blutbahn[16]. Durch die Internalisierung des Rezeptors werden die Lymphozyten in den primären und sekundären Lymphorganen festgehalten, aus denen diese sich nicht mehr mobilisieren können. Durch diese immunologischen Zusammenhänge stellen LPL heutzutage in der Transplantationsmedizin einen hoffnungsvollen Ansatz zur Immunmodulation dar. Ein bekanntes Problem in der Behandlung von nierentransplantierten Patienten ist die durch die Entwicklung einer Transplantationsvaskulopathie bedingte Verschlechterung der Transplantatfunktion[17]. Ein wichtiger Faktoren für die Pathogenese der Transplantatvaskulopathie ist die endotheliale Dysfunktion[18]. In dem zweiten Abschnitt dieser Publikationspromotion soll auf den Einfluss von FTY720 auf die endotheliale Funktion eingegangen werden. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- (1) Wird durch FTY720 die eNOS aktiviert?
- (2) Über welchen Rezeptor wird die eNOS Aktivierung ggf. vermittelt?
- (3) Welcher Signaltransduktionsweg ist in die eNOS Aktivierung ggf. eingeschaltet?

Dem Endothel wird ein wichtiger Einfluss auf die Gefäßphysiologie zugeschrieben. Dabei hat die Fähigkeit der Endothelzellen, vasodilatative Mediatoren, wie NO oder Prostacyclin, zu sezernieren über Jahre im Mittelpunkt des Interesses gestanden. Die Fähigkeit in ausreichendem Maße diese Mediatoren zu sezernieren bestimmt die sogenannte endotheliale Kapazität. Ist diese Kapazität eingeschränkt wird das Endothel als dysfunktionell beschrieben. Die Bedeutung von Endothelzellen als sezernierende Zellen von vasokonstriktiven Substanzen ist hingegen weniger stark untersucht worden. Nach der Entdeckung des potenten Vasokonstriktors Endothelin wurde zum ersten Mal die Rolle des Endothels als Produzent von vasokonstringierenden Substanzen deutlich[19]. Neben diesem Vasokonstriktor konnten noch eine Reihe von anderen vasoaktiven Mediatoren (Metabolite der Arachidonsäure[20], reaktive Sauerstoffradikale (ROS)[21], Nukleosid- und Dinukleosidpolyphosphate[22]) identifiziert werden, die aus dem Endothel freigesetzt werden. Im dritten und letzten Teil dieser Promotionsarbeit soll auf die Identifizierung und Charakterisierung von vasokonstriktiv wirkenden Substanzen aus dem Überstand von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) eingegangen werden. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass erhöhte Scherkräfte zu einer Stimulation der Sekretion von vasoaktiven Substanzen aus dem Endothel und den glatten Gefäßmuskelzellen führen. Von diesen Substanzen ist bisher nur ein kleiner Anteil erfolgreich

identifiziert und charakterisiert. HMECs wurden durch mechanische Kräfte und chemischen Stimulantien zur Sekretion von Hormonen in den Überstand angeregt. Durch diesen Versuchsansatz sollen folgende Fragen untersucht werden:

- (1) Identifikation eines neuartigen vasoaktiven Faktors aus dem Überstand von stimulierten Endothelzellen
- (2) Eingrenzung der biochemischen Zugehörigkeit dieses Faktors.
- (3) Pharmakologische Charakterisierung dieses Faktors.

4. Methoden

Physiologische Versuche an isolierten Aortenringpräparaten

Es wurden die thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto-Ratten (WKY), vom C57Bl6-, eNOS defizienten und SIP₃-Rezeptor defizienten Mäusen vorsichtig frei präpariert und entnommen. Es wurde eine unverzügliche Lagerung in kalter, Carbogen-begaster physiologischer Tyrode-Lösung vorgenommen. Nachdem die Adventitia vorsichtig vollständig abpräpariert worden ist, wurden die Gefäße unter einem Dissektionsmikroskop in 2 mm lange Ringpräparate geschnitten. Diese Ringe wurden auf 2 Drähten in den Kleingefäßmyographen (Kleingefäß-Myograph Modell 410A, Danish Myotechnology, Aarhus/DK) eingespannt. Danach lässt man die Gefäße für 60 Minuten in der 37°C warmen und Carbogen-begasten Tyrodelösung äquilibrieren. Nach Normalisierung des Gefäßinnendruckes wurden die Gefäße während einer Vorkaskade auf ihre Funktionalität überprüft. Nur Gefäße, die festgelegte Bedingungen erfüllten, wurden für die Versuche genutzt. Unter Vorkontraktionsbedingungen wurde der Einfluss von HDL und der assoziierten Lysophospholipide auf den Gefäßtonus von mit Phenylephrin (PE) vorkontrahierten Aortenringen ermittelt. Um den Einfluss von FTY720, der phosphorylierten Form von FTY720, den FTY-Derivaten AAL149, AAL151 und AFD298 auf den Gefäßtonus zu ermitteln, wurden Versuche am Kleingefäßmyographen wie beschrieben durchgeführt. Die Versuche wurden ebenfalls an Aortenringen von Wistar-Kyoto-Ratten (WKY-Ratten), C57BL/6-, eNOS defizienten und SIP₃-Rezeptor defizienten Mäusen durchgeführt.

Intraarterielle Blutdruckmessung

An WKY-Ratten wurde die intraarterielle Blutdruckmessung durchgeführt. Die Ratten wurden durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin/Xylazin (80 bzw. 10 mg/kg) anästhesiert und die Betäubung bedarfsgerecht durch wiederholte Injektion aufrechterhalten. Während des operativen Eingriffes wurde die Körpertemperatur der anästhesierten Ratten von 37 °C durch die Nutzung eines beheizten Operationstisches aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde durch einen Rektalthermistor kontinuierlich gemessen, der mit dem Beheizungssystem des OP-Tisches rückgekoppelt ist. Die Tiere werden tracheotomiert und ein Tubus in die Trachea eingeführt, um Auswirkungen der anästhesiebedingte Hypersekretion zu verhindern. Es wurden unter einem Präparationsmikroskop ein venöser Zugang in die V. jugularis interna sinistra und ein arterieller Katheter in die A. carotis communis dextra gelegt. Über den arteriellen Schenkel wurde kontinuierlich blutig der MAD gemessen. Nach der operativen Positionierung des venösen und des arteriellen Katheters wurde der Blutdruck über eine Äquilibrationszeit von 60 Minuten kontinuierlich aufgezeichnet und erst nach Stabilisierung der Versuch begonnen. Nach der Äquilibrationsphase wurde der MAD erhöht. Dazu wurde nach einer einmaligen intravenösen Endothelin-Bolusapplikation von 500 ng / 0,2 ml kontinuierlich Endothelin in einer Konzentration von 1000 ng/h mittels einer Infusionspumpe verabreicht, wobei ein maximal infundiertes Volumen von 1 ml/h nicht überschritten wurde. Die Endothelin induzierte Erhöhung des MAD wurde solange abgewartet, bis sich der MAD konstant auf

einen im Vergleich zum Ausgangsniveau mindestens 20 mmHg erhöhten Werten gehalten hat. Bei konstant erhöhtem MAD wurden die durch die Applikation von HDL (1 mg/0,2 ml), S1P (200 nM/0,2 ml), SPC (200 nM/0,2 ml) und LSF (200 nM/0,2 ml) Veränderungen des MAD ermittelt. Nach Applikation der Testsubstanz und Stabilisierung des MAD auf das Ausgangsniveau wurde die endothelabhängige Vasodilatation durch intraarterielle Applikation von Acetylcholin (200 nM/0,2 ml) überprüft.

Um die Wirkung von Up4A auf den systemischen Blutdruck zu untersuchen wurden intraarterielle Blutdruckmessungen an WKY-Ratten wie oben beschrieben durchgeführt. Bei konstantem Ruhe-MAD wurde durch die Applikation von Norepinephrin (NE) und Up4A über den arteriellen Schenkel Veränderungen des MAD ermittelt.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von NO

Um die intrazelluläre Produktion von NO nachzuweisen, wurden Experimente an humanen umbilikalen Venenendothelzellen (HUVEC) mit Hilfe des NO-sensitiven zellpermeablen Fluorophores 4,5-Di-Amino-Fluorescein-Diacetat (DAF-2DA) durchgeführt. Zur Detektion der NO-Bildung wurden die HUVECs ($1,2 \times 10^5$ Zellen) auf Gelatine beschichteten Objektträger ausplattiert und für 120 Minuten in RPMI 1640 inkubiert, welchem 1 % FCS (v/v) und 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 30 Minuten in einem Inkubationsschrank bei 37 °C mit DAF-2DA inkubiert. In Anschluss wurden die Zellen insgesamt vierfach gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit HDL (0,5 mg/ml), S1P (10 µM), SPC (10 µM) und LSF (10 µM) stimuliert. In einigen Versuchen wurde die eNOS zuvor mit dem spezifischen Inhibitor L-NAME (100 µM) gehemmt. Die jeweiligen Reaktionen wurden durch die Fixierung der Zellen mit 2 % Paraformaldehydlösung (v/v) für 3 Minuten bei 4 °C gestoppt. Es wurden ausschließlich HUVEC bis maximal zur 4. Passage eingesetzt. Die Betrachtung der Zellen erfolgt unter einem invertierten Fluoreszenzmikroskop. Die ermittelten Bilder wurden mittels des speziell für dieses Mikroskop entwickelten Auswerteprogrammes Axiovision 4.1 (Firma Carl Zeiss) analysiert.

Isoliert perfundierte Rattenniere

Männliche drei bis vier Monate alte Wistar-Kyoto-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 150 und 200 Gramm wurden mittels einer intraperitonealen Urethan-Injektion anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde durch einen Y-Schnitt vom Unterbauch bis zum Zwerchfellansatz eröffnet. Die linke Niere mit der zugehörigen Arteria renalis und die infrarenale Aorta wurde durch stumpfe Dissektion vom umliegenden Bindegewebe frei präpariert, abgeklemmt, ligiert und inzidiert. Ein Polyethylenkatheter wird über die infrarenale Aorta in die A. renalis eingeführt. Die Niere wurde mit 250 IE Heparin perfundiert und direkt an das Perfusionssystem angeschlossen. Die Niere wird über eine peristaltische Pumpe mit einem permanenten Fluss von 8 ml pro Minute perfundiert. Als Perfusat wird mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaste und auf 37°C erhitzte Krebs-Henseleit-Lösung genutzt. Über einen Infusionsschenkel konnten die Testsubstanzen in den Perfusionsfluss hinzu gegeben werden. Die durch die getesteten Substanzen renalen Gefäße hervorgerufenen Effekte wurden als Änderung des Perfusionsdrucks über einen Druckaufnehmer an einem parallel geschalteten Arm des Systems gemessen und über einen Brückenverstärker verstärkt und digital aufgezeichnet. Nach dem Anschluss der Niere an das Perfusionssystem wurde eine Äquilibrationszeit von 60 Minuten abgewartet. Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Niere wurden zu Beginn und am Ende eines jeden Versuchs standardmäßig Bolusinjektionen folgender Substanzen appliziert: Ang II (1 nmol), α , β -methyl-ATP (1 nmol) und Ap4A (1 nmol). Wurde im Versuchsverlauf mit Dauerperfusionen von Antagonisten oder α , β -meATP gearbeitet, so wurden diese Kontrollsubstanzen vor, während und nach der Antagonisierung ein weiteres Mal appliziert.

Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse

Um die Expression der in der Signaltransduktion der eNOS Aktivierung eingeschalteten Moleküle auf Proteinebene zu detektieren, wurden Western Blot Analysen nach etablierter Methodik durchgeführt. Dabei wurden Proteine aus HUVECs mittels Phosphoprotein-Lysepuffer (Fa. Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers isoliert, die DNA bei 100 °C über 12 Minuten denaturiert und sedimentiert. Der Proteingehalt im Überstand wurde mittels BCA-Protein-Detektions-Assay (Fa. Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Durch vertikale Plattenelektrophorese wurden die Proteine nach der Methode von Laemmli in 10%igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Im Anschluss daran wurden die Gele mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und die Proteine fixiert. Zur Entfärbung unspezifischer Anfärbungen wurden die Gele über 4 Stunden mit Coomassie-Entfärber-Lösung behandelt. Danach die aufgetrennten Proteine durch Elektrottransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 μ m) übertragen und für die Immundetektion immobilisiert. Dabei wurde die „semi-dry“ Methode verwendet (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Firma Bio-Rad). Zur Kontrolle eines erfolgreichen Western Blots wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceauot reversibel gefärbt. Durch Immundetektion der jeweiligen Proteine mittels eines spezifischen Primär-Antikörpers (in diesem Fall gegen Rabbit anti-total-eNOS, Rabbit anti-Ser₁₁₇₇-phospho-eNOS, Rabbit anti-total-AKT, Rabbit anti-Ser₄₇₃-phospho-AKT). Das zu messende Protein wird semiquantitativ darstellbar durch Bindung eines Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Rabbit-IgG-

Sekundärantikörper an den Primär-Antikörper mit anschließender chemiluminometrischer Visualisierung mittels ECL-Chemilumineszenz-Reagenz (Fa. Amersham) nach Angaben des Herstellers. Die Membran wurde in einer Röntgenkassette mit einem Hyperfilm ECL gelegt und entwickelt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Eine Vielzahl an Erkrankungen, insbesondere die atherosklerotische Gefäßerkrankungen, basieren auf einer signifikanten Veränderung der physiologischen Umgebung oder der morphologischen Schädigung der Einzelzellschicht. Es ist eine große Anzahl an proatherogenen Faktoren bekannt (Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, Adipositas, Hyperlipidämie, Hyperhomozysteinämie oder genetischer Hintergrund)[4, 5, 6]. Genauso sind heute atheroprotektive Faktoren bekannt. Einer der bedeutendsten Faktoren sind HDL-Moleküle[23]. Aus einer langen Zeit der epidemiologischen Beobachtung heraus, haben sich die gegen Atherosklerose schützenden Eigenschaften von HDL-Molekülen immer deutlicher statistisch herausarbeiten lassen[24]. In den 60iger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde von Glomset die antiatherogene Funktion der HDL auf die Fähigkeit des Cholesterintransportes von peripheren Zellen zur Leber, dem reversen Cholesterintransport, verstanden[7]. Diese These hielt sich über Jahrzehnte und konnte auch gut untermauert werden. Die komplex strukturierten HDL-Moleküle scheinen aber weit mehr zu sein als reine Cholesterintransporter. HDL-Moleküle sind Trägermoleküle für eine große Anzahl an Proteinen und Lipiden. Eine große Anzahl an Studien konnte eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Plasmaspiegels von HDL und der endothelabhängigen Gefäßdilatation nachweisen[25]. Kürzlich konnte durch die Verabreichung von rekombinant hergestelltem HDL die eingeschränkte endotheliale Kapazität bei Männern mit Hypercholesterinämie signifikant verbessert werden[26]. Der Einfluss von HDL Molekülen auf die endotheliale Funktion ist durch eine Reihe von verschiedenen Mechanismen begründet worden. Darunter sind die Synthese von vasorelaxierenden Prostanoiden, wie Prostaglandin E₂ oder I₂ [27]. 2001 konnte die Arbeitsgruppe um Yuhanna erfolgreich zeigen, dass HDL-Moleküle zu einer direkten Stimulation eines der unter physiologischen Bedingungen bedeutendsten gefäßprotektiven Enzymsysteme, der endothelialen NO-Synthase, führt[8]. Über die Aktivierung der eNOS mit anschließender NO-Sekretion reguliert das Endothel eine Reihe von physiologischen Prozessen. NO bewirkt eine direkte Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen mit einer einhergehenden Vasodilatation der Gefäße, eine Hemmung der Leukozytenadhäsion an das Endothel, eine Stabilisierung der Endothelpermeabilität mit einer Verhinderung des Übertritts von Leukozyten oder gefäßschädlicher Moleküle in die glatte Gefäßmuskelschicht und wirkt antiapoptotisch auf Endothelzellen[28]. Für die HDL induzierte eNOS Aktivierung ist die Bindung des HDL-assoziierten ApoA1-Lipoproteins an den „Scavenger receptor BI“ (SR-BI-Rezeptor) notwendig[8]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass isoliertes ApoA1-Protein keine Aktivierung der eNOS über die Aktivierung des SR-BI bewirkt[8]. In dem ersten Teilprojekt dieser Publikationspromotion wurden die einzelnen Bestandteile der HDL-Fraktion systematisch auf die Fähigkeit, eNOS zu aktivieren, untersucht. Übereinstimmend zu der 2001 von Yuhanna veröffentlichten Ergebnissen konnte erfolgreich die Aktivierung der eNOS durch isoliertes HDL nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Studie eingesetzte HDL-Konzentration ist äquivalent zu der physiologische vorliegenden Konzentration (0.8 – 1.2 mg/ml HDL Protein entsprechen ungefähr 40-70 mg HDL Cholesterol/dl). In vorkontrahierten Aortenringen von C57BL/6 Mäusen mit intaktem Endothel bewirken HDL eine dosisabhängige Vasodilatation (Abbildung 1a und Abbildung 1c). Diese Vasodilatation kann durch chemische

Hemmung der eNOS durch den spezifischen Inhibitor L-NAME und durch mechanische Endothelentfernung vollständig unterdrückt werden. In vorkontrahierten Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen konnte ebenfalls keine signifikante Vasodilatation durch HDL induziert werden. Die chemische Hemmung der Cyclooxygenase oder der Cytochrom-P450-Oxidoreduktase, beides Enzymsysteme, die ihrerseits vasorelaxierende Moleküle (Prostazyklin, Eicosanoide) synthetisieren, konnte die HDL induzierte Vasodilatation nicht signifikant verändern, ein weiterer Beweis der eNOS abhängigen Vasodilatation. Die direkte HDL induzierte NO-Liberation aus kultivierten HUVECs konnte mittels des NO sensitiven Fluorophors DAF-2DA visualisiert werden. Durch pharmakologische Hemmung der eNOS durch L-NAME konnte der NO-abhängige Fluoreszenzanstieg unterbunden werden (Abbildung 1b). In Parafinschnitte konnte die HDL-induzierte Phosphorylierung der eNOS immunhistochemisch dargestellt werden (Abbildung 1d). Die direkte systemische arterielle Applikation von isolierten HDL-Molekülen in Wistar-Kyoto-Ratten bewirkte eine schnell einsetzende und kurz anhaltende Verminderung des systemischen mittleren arteriellen Mitteldruckes (Abbildung 1e). 1999 konnte Dimmeler und Mitarbeiter erfolgreich nachweisen, dass die Aktivierung der AKT-Kinase durch vermehrte Phosphorylierung ein entscheidender Schritt in der Aktivierung der eNOS darstellt[29]. Die Inkubation von humanen umbilikalen Venenendothelzellen mit isolierten HDL-Molekülen bewirkte eine vermehrte zeitabhängige Phosphorylierung der AKT-Kinase und der eNOS (Abbildung 1f und 1g). Die Liberation von NO durch den Einfluss verschiedener bekannter Stimulatoren (VEGF, Östrogene, IGF-1) wird über die Aktivierung dieses Enzyms durch die Phosphorylierung am Serin¹¹⁷⁷ bewirkt[30, 31, 32]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass eine protektive Wirkung von HDL Molekülen auf Endothelzellen gegenüber Apoptose über diese Aktivierung der AKT-Kinase vermittelt wird[33]. In der vorliegenden Publikationspromotion konnte nachgewiesen werden, dass die HDL induzierte eNOS Aktivierung das Serin¹¹⁷⁷ innerhalb der eNOS eine Phosphorylierungsstelle der AKT-Kinase in HUVECs ist, wie es für andere Endothelzellen bereits gezeigt werden konnte[34]. Die Aktivierung der eNOS durch HDL konnte durch die Inhibition der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) durch den spezifischen Inhibitor Ly294002 unterdrückt werden. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der eNOS durch HDL über die Aktivierung der PI3-Kinase mit einhergehender Aktivierung der AKT-Kinase teilweise verläuft, denn durch die Inhibition der PI3-Kinase konnte lediglich ca. 50 % der HDL induzierten Vasorelaxation inhibiert werden. Diese Befunde lassen auf das Vorhandensein alternativer Signaltransduktionswege (AKT-unabhängig) bis zur Aktivierung der eNOS schließen. In der vorliegenden Untersuchung konnte die von Gong aufgestellte These[9], dass nur weibliches HDL-Moleküle zu einer Aktivierung der eNOS führen nicht bestätigen. Mehrere unabhängige Isolationen von HDL-Molekülen von unterschiedlichen weiblichen Probanden zeigten sowohl in physiologischen, als auch in zellbiologischen Versuchen eine signifikante Aktivierung eNOS (Abbildung h). Die HDL-induzierte Aktivierung der eNOS und die damit einhergehende Vasorelaxation war an thorakalen Aortenringen von S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen signifikant schwächer ausgeprägt im Vergleich zu den Verhältnissen an thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen. Dieser Befund zeigt, dass ein Teil der HDL induzierten eNOS Akti-

vierung über die Stimulation des S1P₃-Rezeptors verläuft (Abbildung 1h). Im nächsten Schritt wurden die HDL-Moleküle in die beiden großen Teilkomponenten, die Protein- und Lipidfraktion, aufgetrennt. In physiologischen Versuchen an isolierten Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen wurde die eNOS von der isolierten HDL-Lipidfraktion in einer im HDL vorliegenden Konzentration stimuliert. Übereinstimmend mit den Vorbefunden wurde durch die Proteinfraction, insbesondere durch das quantitativ wichtigste Protein ApoA1-Lipoprotein, keine signifikante Veränderung des Vasotonus der vorkontrahierten Aortenringe ausgelöst. Aus der Lipidfraktion wurden die quantitativ wichtigsten Komponenten isoliert weiter untersucht. Cholesterin und Sphingomyelin führten zu keiner signifikanten Veränderung des Vasotonus, wohingegen Lysophosphatidylcholin (LPC) eine signifikante Vasokonstriktion bewirkte. Eine weitere quantitativ bedeutsame Gruppe an Lipide, die der LPL, insbesondere S1P, SPC und LSF, zeigten potente eNOS aktivierende Eigenschaften. In physiologischen Versuchen an vorkontrahierten Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen bewirkten diese LPL eine konzentrationsabhängige Vasodilatation, die durch Hemmung der eNOS mittels L-NAME und durch mechanische Endothelentfernung vollständig unterbunden werden konnte (Abbildung 2a). In vorkontrahierten Aortenringen von eNOS defizienten Tieren wurde durch S1P eine Vasokonstriktion festgestellt, wobei SPC und LSF den Gefäßtonus nicht signifikant veränderten (Abbildung 2b). In HUVEC konnte in Übereinstimmung mit den physiologischen Versuchen mit Hilfe des NO sensitiven Fluorophors DAF-2DA die LPL induzierte NO-Produktion fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden (Abbildung 2d). Die Wirkung von S1P auf den Gefäßtonus verschiedener Gefäßabschnitte variiert sehr in Abhängigkeit der exprimierten Rezeptoren. In zerebralen, mesenterialen und renalen Gefäßabschnitten ist S1P beispielsweise ein Vasokonstriktor[35]. In Western Blot Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass S1P, SPC und LSF, übereinstimmend zu den Befunden durch HDL, die Akt-Kinase und die eNOS durch Phosphorylierung aktivieren (Abbildung 2e). Innerhalb der Gefäßphysiologie besitzen zwei der bekannten S1P-Rezeptoren, der S1P₁- und S1P₃-Rezeptor, eine Bedeutung insbesondere auf die Endothelfunktion[36]. Auf der Zelloberfläche einer Reihe von kultivierten Endothelzellen (HUVECs, HMECs) werden diese Rezeptoren stark exprimiert (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). In Dilatationsversuchen an thorakalen Aortenringen von S1P₃ defizienten Mäusen und in Western Blot Analysen aus isolierten Endothelzellen aus S1P₃ defizienten Mäusen konnte herausgearbeitet werden, dass die Aktivierung des S1P₃ Rezeptor durch S1P, SPC und LSF in den Signaltransduktionsweg eingeschaltet ist (Abbildung 2f). Im Gegensatz zu der in Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen durch S1P, SPC und LSF induzierten Vasodilatation, konnte in Aortenringen von S1P₃ Rezeptor defizienten Mäusen keine Vasodilatation detektiert werden (Abbildung 2f). Dabei bestehen keine signifikanten Unterschiede in der endothelialen Kapazität zwischen C57Bl/6 und S1P₃ defizienten Mäusen in Bezug auf die endothelabhängige Vasodilatation auf Acetylcholin und der endothelunabhängigen Vasodilatation auf Natriumnitroprussid. In Western Blot Untersuchungen an S1P₃ Rezeptor defizienten Endothelzellen wurde die AKT und eNOS im Vergleich zu Endothelzellen aus C57Bl/6 Mäusen signifikant schlechter durch den Einfluss von HDL phosphoryliert (Abbildung 2 g). Durch die Inkubation dieser S1P₃-Rezeptor defizienten Endothelzellen mit S1P, SPC oder LSF wurde keine signifikante

Phosphorylierung der AKT oder eNOS induziert (Abbildung 2g). Um die Frage nach einer physiologischen Relevanz dieser Befunde zu beantworten, wurde isoliertes S1P, SPC und LSF intraarteriell in eine Wistar-Ratte appliziert und gleichzeitig der Blutdruck invasiv gemessen kontinuierlich aufgezeichnet. Die Applikation von S1P, SPC und LSF verursachte eine unmittelbare kurzzeitig signifikante Verminderung des mittlere systemischen arteriellen Blutdrucks (Abbildung 1d, Abbildung 2c). 2003 wurde die HDL induzierte eNOS Aktivierung von Gong mit den HDL-assoziierten Östrogene zu erklären versucht[9]. Die Autoren konnten interessanterweise zeigen, dass die isolierten HDL-Moleküle aus weiblichem Plasma eine sehr potente eNOS Aktivierung verursachen, wohingegen das aus männlichem Plasma isolierte HDL keine Aktivierung der eNOS zeigt. Die Autoren konnten korrespondierend zu diesem Befund eine Östrogenkonzentration im pikomolaren Bereich im weiblichen HDL und keine Östrogene im männlichen HDL nachweisen. Kritisch diskutiert ist zu erwähnen, dass die innerhalb der weiblichen HDL-Moleküle nachgewiesenen Östrogenkonzentrationen um den Faktor 10^4 bis 10^5 geringer sind als diejenigen, die eine Aktivierung der eNOS bewirken. Um diesen Befund näher zu untersuchen, wurden geschlechterspezifische HDL-Fractionen isoliert und auf Vasoaktivität untersucht. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass sowohl HDL-Isolationen aus weiblichem Plasma, als auch HDL-Isolationen aus männlichem Plasma eine signifikante Vasodilatation an vorkontrahierten Aortenringen von C57Bl6 Mäusen bewirkt (Abbildung 1h). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der durch die einzelnen HDL-Isolate induzierte Vasodilatationen nachgewiesen werden, wobei die HDL Isolate aus dem Plasma von weiblichen Probanden tendenziell eine stärkere Vasodilatation bewirkten. Interessanterweise hatten männlichen Probanden weniger S1P im HDL als weibliche Probanden, wobei der Unterschied in der kleinen Probenanzahl (jeweils $n=7$) nicht signifikant war. Zusammenfassend konnten im ersten Teilabschnitt dieser Publikationspromotion zum ersten Mal spezielle HDL-Komponenten, die Lysophospholipide, als biologisch wirksame Moleküle mit potenziell antiatherogener Wirkung und derer Signaltransduktionskaskade beschrieben werden.

HDL sind sehr komplex aufgebaute Moleküle, die eine Reihe von verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen aktivieren können, wofür spezifische Komponenten der HDL-Moleküle jeweils identifiziert werden konnten. Im Rahmen dieser Publikationspromotion konnten durch die Auftrennung der HDL-Moleküle in die Lipid- und Proteinfraction eindeutig nachgewiesen werden, dass die eNOS aktivierenden Komponenten Bestandteile der Lipidfraction sind. Die Proteinfraction, insbesondere das Apo-Lipoprotein AI, verursachten keine signifikanten Veränderungen des Vasotonus von vorkontrahierten Aortenringen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Befunden einervorangegangenen Studie[8]. Innerhalb der Lipidfraction wurden die quantitativ bedeutendsten Komponenten auf die eNOS aktivierende Eigenschaft untersucht. Durch systematische Untersuchungen konnten 3 Lysophospholipide, alle Bestandteil der HDL-Moleküle, identifiziert werden, die eine Aktivierung der eNOS bewirkten. Diese Lysophospholipide bewirkten eine eNOS Aktivierung in Konzentrationen, die ebenfalls in HDL-Molekülen vorliegen. In einem mg HDL sind im Durchschnitt 287 ± 17 pmol S1P[37] und 290 ± 20 pmol

SPC[37] enthalten. Die systemische Applikation von 1 mg HDL, sowie 200 nmol S1P oder SPC in eine WKY-Ratte verursacht eine direkte signifikante kurzfristige Verminderung des MAD. In vivo sind aber im Vergleich zu den in vitro Daten eine Bemerkungen zu machen. Die innerhalb des HDL-Moleküls enthaltenen Lysophospholipide könnten synergistisch an den entsprechenden Rezeptoren wirken. Die Bindung von HDL-Molekülen an den SRBI-Rezeptor könnte zu einer räumlichen Anordnung der im HDL enthaltenen Lysophospholipide am vermittelnden Rezeptor führen, so dass die lokale Konzentration deutlich höher ist, als bei den Lysophospholipiden in Lösung.

Die biologisch aktiven Lysophospholipide wirken über spezifische plasmamembranständige G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden nach dem stärkeren Agonisten, S1P, auch S1P-Rezeptoren genannt [13, 38, 39, 40]. Zur Zeit sind 5 unterschiedliche S1P-Rezeptoren bekannt (S1P₁₋₅). Über die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirken Lysophospholipide eine Reihe von biologischen Wirkungen, wie z.B. Angiogenese und Verlängerung des Überlebens von Endothelzellen[41]. Sowohl die Lysophospholipide aktivieren verschiedene spezifische S1P-Rezeptoren, wovon der S1P₁-, S1P₂- und der S1P₃-Rezeptor auf Endothelzellen exprimiert werden[42, 43, 44]. SPC aktiviert darüber hinaus weitere spezifische SPC-Rezeptoren (OGR-1, GPR4, G2A)[45]. Die in dieser Publikationspromotion beobachteten Effekte von HDL und den Lysophospholipiden auf die AKT-Aktivierung und eNOS-Aktivierung mit einhergehender NO-Liberation konnten durch die Wirkung von Pertussistoxin unterbunden werden. Dieser Befund lässt auf den Einfluss eines PTX-sensitiven G_i-Proteins schließen. In isolierten thorakalen Aortenringen von S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen konnte durch den Einfluss von S1P, SPC und LSF keine signifikante Veränderung der durch PE induzierten Vorkontraktion beobachtet werden. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass über die Aktivierung dieser Rezeptor die eNOS Aktivierung gesteuert wird. In Western Blot Untersuchungen an isolierten glatten Gefäßmuskelzellen aus S1P₃ defizienten Mäusen konnten durch S1P, SPC und LSF keine Aktivierung der AKT und keine Phosphorylierung der eNOS bewirkt werden. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Teil der durch HDL induzierten eNOS Aktivierung (ca. 50 %) über die assoziierten Lysophospholipide über die Aktivierung des S1P₃-Rezeptors mediiert wird. Dabei hängt die Wirkung der Lysophospholipide vom jeweiligen Gefäßtonus ab. Die vasodilatierende Wirkung der LPL konnte in den Versuchen an den isolierten Aortenringen nach Vorkontraktion beobachtet werden. Unter basalen, nicht vorkontrahierten Bedingungen verursachten S1P und SPC eine gering gradige, aber signifikante Vasokontraktion. Ein Befund der durch mehrere Studien gezeigt werden konnte[46]. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in dieser Vasokonstriktion zwischen C57Bl/6 Mäusen und S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen beobachtet werden, so dass diese vasokonstriktive Komponente nicht über den S1P₃-Rezeptor vermittelt zu sein scheint. Die auch unter Vorkontraktion zu beobachtende vasokonstriktive Wirkung von S1P und SPC an isolierten thorakalen Aortenringen von eNOS- und S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen unterstreicht die duale Wirkung der LPL auf den Vasotonus. Die Lysophospholipide innerhalb der getesteten HDL-Moleküle sind für ca. 50 % der HDL induzierten eNOS Aktivierung verantwortlich.

Im zweiten Teil der Publikationspromotion wurde die Wirkung des Immunmodulators FTY720 auf die endotheliale Funktion untersucht. FTY720 ist ein Derivat einer aus dem Pilz *Isaria sinclairii* isolierten Substanz Myriocin[47]. Myriocin vermittelt sehr potente immunmodulatorische Wirkungen, besitzt aber starke Nebenwirkungen[48]. Daher musste die Struktur von Myriocin so verändert werden, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften erhalten blieben, die Nebenwirkungen jedoch deutlich schwächer ausgeprägt waren. Dieses oral verfügbare Medikament ist FTY720. FTY720 ist ein strukturelles Homolog eines endogenen LPL, dem Sphingosin[16]. Die Lysophospholipide FTY720 und Sphingosin sind beides Vorläufermoleküle, die durch eine endogene Sphingosinkinase (SpK) zu den aktiven Metaboliten, S1P und FTY720-Phosphat phosphoryliert werden müssen[49]. FTY720 ist ein sehr potenter Agonist an 4 der 5 heutzutage bekannten S1P-Rezeptoren (S1P₁, S1P₃, S1P₄, S1P₅)[16]. Die immunmodulatorische Wirkung von FTY720 ist auf eine irreversible Internalisierung des S1P₁ Rezeptor nach Bindung zurückzuführen. Neben der immunmodulatorischen Wirkung von LPL sind ebenfalls direkte Effekte auf die Gefäßregulation bekannt[37]. Aufgrund der strukturellen Homologie zu S1P und der agonistischen Wirkung von FTY720 am S1P₃ Rezeptor wurde die Bedeutung von FTY720 auf die Gefäßphysiologie untersucht. In Dilatationsstudien an vorkontrahierten Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen konnte eine potente vasodilatatorische Wirkung von FTY720 und von FTY720-P in einer Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden (Abbildung 3a, Abbildung 3b, Abbildung 3c). Durch mechanische Endothelentfernung und Inhibition der eNOS durch L-NAME (Abbildung 3d) konnte die FTY720 und FTY720-P induzierte Vasodilatation vollständig aufgehoben werden. Es konnte ebenfalls keine signifikante Vasodilatation in vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen durch FTY720 und FTY720-P beobachtet werden (Abbildung 3e). In Western Blot Untersuchungen konnte konzentrations- und zeitabhängig nachgewiesen werden, dass FTY720 und FTY720-P eine Phosphorylierung der AKT und eNOS bewirken. Die Inhibition der Phosphoinositol-3-Kinase, ein für die Phosphorylierung der AKT essentielles Enzym[29], durch den spezifischen Inhibitor Ly294004 verhinderte die FTY720 und FTY720-P induzierte Phosphorylierung der AKT und eNOS. FTY720 und FTY720-P induzierten beide einen Fluoreszenzsignalintensitätsanstieg des NO-sensitiven Fluorophors DAF-2DA, der durch die pharmakologische Inhibition des eNOS durch L-NAME unterbunden wurde (Abbildung 3f). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Phosphorylierungsschritt von FTY720 zu FTY720-P für die FTY720 Wirkung ist, weil FTY720 und FTY720-P in den jeweiligen Untersuchungen vergleichbare Wirkung zeigten. Es wurden Dilatationsstudien an thorakalen Aortenringen von C57Bl6 Mäusen unter Inhibition der Sphingosinkinase (SpK) durch den spezifischen Inhibitor Dimethylsphingosin (DMS) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde ausschließlich durch FTY720-P eine signifikante Vasodilatation verursacht, wohingegen FTY720 keine signifikante Veränderung der Vorkontraktion bewirkte (Abbildung 3g). In Western Blot Untersuchungen konnte unter Inhibition der SpK eine FTY720-P induzierte Phosphorylierung der AKT und eNOS beobachtet werden, wohingegen die nicht phosphorylierte Form von FTY720 keine Wirkung auf die Phosphorylierung von AKT und eNOS zeigte. Damit ist eindeutig gezeigt worden, dass FTY720 ein inaktives Vorläufermolekül ist, welches durch Phosphorylierung durch die SpK aktiviert wird. Diese

Befunde stehen in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Studien, in denen FTY720-P als aktiver Metabolit identifiziert worden ist[49, 50]. Um diesen Befund zu bestätigen wurden Experimente mit strukturellen Analoga von FTY720 durchgeführt. AAL151 ist ein durch die SpK phosphorylierbares Isomer von FTY720, wohingegen AAL149 ein nicht phosphorylierbares, somit inaktives, Isomer ist. AFD298 ist die phosphorylierte biologisch aktive Form von AAL151. Übereinstimmend mit den Vorbefunden konnte gezeigt werden, dass AAL151 und AFD298 eine konzentrationsabhängige eNOS Aktivierung bewirken, wohingegen das inaktive Isomer AAL149 keinen Einfluss auf die eNOS Aktivierung besitzt (Abbildung 3h). Übereinstimmend mit den S1P-Vorbefunden konnte weder durch FTY720, noch durch FTY720-P eine signifikante Veränderung der Vorkontraktion in Aortenringen von S1P₃ Rezeptor defizienten Tieren induziert werden (Abbildung 3i). Zusammenfassend zeigt sich, dass der LPL-basierte Immunmodulator FTY720 zu einer HDL- und S1P vergleichbarer eNOS Aktivierung über Aktivierung des S1P₃-Rezeptors und der AKT-Kinase führt. Die Bedeutung dieses Befundes liegt in erster Linie im Bereich der Transplantationsmedizin. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass eine immunmodulatorische Substanz durch Aktivierung einer rezeptorabhängigen Signaltransduktionskaskade eine direkte Wirkung auf das Endothel besitzt. Die notwendige Langzeitbehandlung der organtransplantierten Patienten mit den heute üblichen Immunsuppressiva (Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus) führt zu einer progredient entwickelnden Transplantationsvaskulopathie, die ein führender Grund der Transplantatfunktionsverschlechterung bis hin zum Transplantatversagen ist [51]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die sich unter der Behandlung mit Cyclosporin entwickelnde Vaskulopathie signifikant durch die Kombinationstherapie mit Cyclosporin A und FTY720 reduziert werden kann[52]. Somit stellt die FTY720 induzierte eNOS Aktivierung einen Hinweis auf einen möglichen, neben der immunmodulatorischen Funktion, zugrunde liegenden Mechanismus dar.

Im dritten Teil dieser Publikationspromotion wurde versucht, aus stimulierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) einen neuartigen vasoaktiven Faktor zu isolieren. Dabei wurden die HMEC auf verschiedene Weise stimuliert, wobei zum einen mechanische Belastung, zum anderen chemische Stimulatoren (Endothelin, ATP, UTP, Acetylcholin, A23187) eingesetzt wurden. Die jeweiligen Endothelzellüberstände (EZÜ) wurden abgenommen und mit Hilfe der isoliert perfundierten Rattenniere (IPN) auf Vasoaktivität überprüft. Dabei zeigte sich, dass die EZÜ der verschiedenen Stimulationsreihen in der IPN zu einem signifikanten Anstieg des Perfusionsdrucks führten (Abbildung 4a). Durch pharmakologische Inhibition wurde die gesuchte Substanzklasse weiter eingeschränkt. Es ist bekannt, dass das Endothel eine Reihe von vasoaktiven Substanzen produziert und liberiert. Zwei bedeutende Hauptgruppen sind Endothelin und Nukleotide[19, 53]. In Versuchen unter Inhibition des Endothelin-Rezeptors A (ET_a) mit dem spezifischen Inhibitor BQ123 konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer, aber signifikanter Anteil (ca. 10 %) des durch die EZÜ ausgelösten Perfusionsdruckanstiegs gehemmt werden konnte. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Mononukleotiden auf den EZÜ induzierten Perfusionsdruckanstieg untersucht. Dazu wurden die im EZÜ enthaltenen Mononukleotide durch die Anwesenheit von alkalischer Phosphatase degradiert. Dadurch wurde die Vasoaktivität um weitere ca. 40 % reduziert (Abbildung 4a

und 4b). Durch die Inhibition von P2X-Rezeptoren mit den unspezifischen Inhibitoren Suramin und PPADS wurde der restliche Anteil an der Perfusionsdruckerhöhung um weitere ca. 30 % gehemmt (Abbildung 4a und 4b). Da ein großer Anteil der Vasoaktivität des EZÜ nach Degradierung der Mononukleotide durch unselektive Hemmung von P2X-Rezeptoren vermindert werden konnte, kamen als mögliche auslösende Faktoren Dinukleotsidpolyphosphate in Betracht. Durch chromatographische Auftrennung und MALDI Experimente (durchgeführt von Herrn PD Dr. rer. nat. Joachim Jankowski und Mitarbeitern) konnte in mehreren Schritten ein Dinukleosidpolyphosphat, Uridin Adenosin Tetraphosphat (Up4A) isoliert werden. Bei Up₄A handelt es sich um ein zum ersten Mal beschriebenes Molekül, das sich aus einem Pyrimidin (Uridin) und einem Purin (Adenosin) zusammensetzt. Während der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden ca. 850 - 900 Fraktionen mit Hilfe der IPN auf Vasoaktivität untersucht. Auf diesem Wege konnte man die interessierenden Fraktionen immer weiter einengen. In den nach der Aufreinigung von Up4A mit der Reinsubstanz durchgeführten physiologischen Versuchen wurde die pharmakologische Charakterisierung von Up4A an der IPN durchgeführt (Abbildung 4c). Durch die Dauerperfusion des intrarenalen Gefäßsystems mit α,β -methylen-ATP, einer Substanz, die die P2X1- und P2X3-Rezeptoren vollständig desensibilisiert, wurde die durch Up4A ausgelöste Erhöhung des Perfusionsdruckes signifikant um ca. 75 % vermindert. Die starke Verminderung der Vasoaktivität durch α,β -methylen-ATP deutet auf die Bedeutung des P2X1- und P2X3-Rezeptors hin, wobei in der glatten Gefäßmuskelzelle der P2X1-Rezeptor die dominierende Untergruppe an P2X-Rezeptoren ist. Um zwischen dem P2X1- und dem P2X3-Rezeptor pharmakologisch diskriminieren zu können, wurden Versuche mit NFO23, TNP-ATP und Diinosin-Pentaphosphat (Ip5I) durchgeführt (Abbildung 4d). Diese beiden Substanzen sind P2X1- und P2X3-Antagonisten, wobei eine P2X1:P2X3 Rezeptoraffinität von 1 (TNP-ATP), 20 (NFO23), bzw. 1000 (Ip5I) besteht. Diese Antagonisten wurden in einer Konzentration eingesetzt, die bekanntermaßen P2X1-Rezeptoren zu einem überwiegenden Teil blockt ($\geq EC_{75}$), wohingegen eine schwache Wirkung auf P2X3-Rezeptoren besteht ($\leq EC_{25}$). Unter Dauerperfusion mit diesen Konzentrationen von NFO23 und Ip5I wurde die Wirkung von Up4A stark vermindert, ein Befund, der den Einfluss des P2X1-Rezeptors weiter unterstützt. Die unter α,β -methylen-ATP beobachtete Restaktivität von Up4A macht die Wirkung von Up4A an der zweiten Unterklasse von Purinrezeptoren, den P2Y-Rezeptoren, wahrscheinlich. Alle heute bekannten Uridin-enthaltenden Nukleotide besitzen eine Affinität zu P2Y-Rezeptoren. Für den P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptor ist eine direkte Bedeutung auf den Gefäßtonus beschrieben[54]. Ein weiterer Grund für die beobachtete restlich Vasoaktivität von Up4A könnte in der Bildung der Abbauprodukten ATP und UTP liegen. Sowohl für ATP, als auch für UTP ist eine eigene Vasoaktivität auf das renale Gefäßsystem bekannt. Im Vergleich der jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurven zeigte jedoch sich, dass sowohl ATP, als auch UTP eine signifikant geringere Vasoaktivität besitzen als Up4A. Somit kann die durch die Degradationsprodukte ausgelöste Vasoaktivität als eher gering eingeschätzt werden. Im Rahmen des Projektes wurde die Plasmakonzentration von Up4A im humanen Plasma (durchgeführt von Herrn PD Dr. rer. nat. Joachim Jankowski und Mitarbeitern) mit 55 nmol/l bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Up4A in dieser Konzentration signifikante Veränderungen des renalen Perfusionsdruckes bewirkt. Um

die Bedeutung von Up4A auf den systemischen mittleren Blutdruck einer Ratte zu überprüfen, wurde Up4A intraaortal appliziert und der Blutdruck kontinuierlich intraarteriell gemessen. Die Wirkung von Up4A wurde mit der von Noradrenalin (NE) verglichen. Die Applikation von NE bewirkte einen starken, aber lediglich kurzen Anstieg des MAD, wohingegen die Applikation von der gleichen Dosis Up4A zu einer schwächeren, aber signifikant länger anhaltenden Erhöhung des MAD führte (Abbildung 4e). Ein Befund der auf eine längere Halbwertszeit von Up4A beruhen könnte. Dinukleosidpolyphosphate sind durch die chemische Zusammensetzung gegen eine rasche Degradierung geschützt [55]. Die Stimulation von Endothelzellen mit Endothelin führte zu einer signifikanten Zunahme der Up4A Sekretion in den Überstand, so dass man eine Bedeutung von Up4A an der Endothelin induzierten Vasoaktivität postulieren kann. Zusammenfassend kann man sagen, dass Endothelzellen autokrin und parakrin aktive Zellen darstellen. Durch eine Reihe von Einflussfaktoren von mechanischem Reiz bis hin zu unterschiedlichen chemischen Reizen werden Endothelzellen zur Sekretion von vasoaktiven Hormonen angeregt. Im Rahmen dieser Publikationspromotion konnte zum ersten Mal ein neues vasoaktives Hormon, das gemischte Dinukleosidpolyphosphat Up4A, identifiziert, aufgereinigt und pharmakologisch charakterisiert werden. Dieses neuartige Dinukleosidpolyphosphat ist ein potenter Vasokonstriktor im renalen Perfusionsgebiet und vermag nach intraarterieller Applikation den MAD über einen signifikant langen Zeitraum zu erhöhen. Damit könnte Up4A als eines der „endothelium-derived contraction factors“ einen Einfluss auf unterschiedliche Formen der Hypertonie besitzen.

Anhang 1: Lebenslauf**Lebenslauf von Markus Tölle**

Name: Tölle
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 04.09.1975, Herne
Familienstand: ledig
Eltern: Karl-Heinz Tölle, Lehrer i.R.
Ulrike Tölle, geb. Rasche, Lehrerin
Schulbildung: 1982 - 1995: Grundschule und Gymnasium Herne
Abitur: 1995
Studium: 1995 – 2001: Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität
Bochum (1995 – 2000) und der Freien Universität Berlin (2001-2002)
Juni 2002: Teilapprobation
Dezember 2003: Approbation

Tätigkeit als

Arzt: Seit Juni 2002 wissenschaftlicher Mitarbeiter und AiP an der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. W. Zidek)

Seit Dezember 2003: wissenschaftlicher Mitarbeiter Medizinische Klinik IV der Charite – Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. W. Zidek)

Berlin, den 30. Mai 2006

Anhang 2: Publikationsverzeichnis, Abstracts, Vorträge, Förderungen**Originalarbeiten****Erstautorschaften**

1. **Tölle M***, Levkau B*, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schönfelder G, Schäfers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, van der Giet M. The immunomodulator FTY720 induces eNOS-dependent arterial vasodilation via the lysophospholipid receptor S1P₃. Circulation Research. 2005; 96:913-20. (IF: 10.117)

* beide Autoren haben in gleicher Weise zu dem Manuskript beigetragen.

2. Jankowski V*, **Tölle M***, Vanhoulde R, Schönfelder G, van der Giet M, Henning L, Paul M, Schlüter H, Zidek W, Jankowski J. Identification of uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) as an endothelial-derived vasoconstrictive factor. Nature Medicine, 2005, 11:223-227. (IF: 31.223)

* beide Autoren haben in gleicher Weise zu dem Manuskript beigetragen

3. Giebing G*, **Tölle M***, Jürgensen J, Furkert J, Beyermann M, Neuruber-Schäfer F, Rosenthal W, Zidek W, van der Giet M, Oksche A. Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction. Circulation research . 2005; 97: 707-715.. (IF: 10,117)

* beide Autoren haben in gleicher Weise zu dem Manuskript beigetragen

Koautorschaften

1. van der Giet M, Schmidt S, **Tölle M**, Jankowski J, Schlüter H, Zidek W, Tepel M. Effects of dinucleoside polyphosphates on coronary vascular tone regulation. European Journal of Pharmacology. 2002; 448: 207 - 213. (IF: 2.164)
2. Jankowski J, van der Giet M, Schmidt S, Hemeier M, Mahn B, Giebing G, **Tölle M**, Luftmann H, Schlüter H, Jankowski V, Zidek W, Tepel M. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. Journal of Clinical Investigation. 2003; 112: 256-264 (IF: 14.118)
3. Nofer JR, van der Giet M, **Tölle M**, Wolinska I, Sokoll A, von Wnuck-Lipinski K, Baba HA, Gödecke A, Ishii I, Chun J, Kleuser B, Völker W, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P₃: role of HDL-associated lysophospholipids. Journal of Clinical Investigation. 2004; 113: 569 – 581. (IF: 14.118)
4. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Henning L, **Tölle M**, Giebing G, Schönfelder G, Krakow A, Karadogan S, Gustavsson N, Gobom J, Webb J, Lehrach H, Schlüter H, Zidek W, Jankowski J. De-

tection of angiotensin II in supernatants of stimulated mononuclear leukocytes by MALDI-TOF-TOF-mass spectrometric analysis. Hypertension 2005; 46: 591-597. (IF: 5.630)

5. Westhoff T, Scheid S, **Tölle M**, Kaynak B, Schmidt S, Zidek W, Sperling S, van der Giet M. A physiogenomic approach to study the regulation of blood pressure. Physiol Genomics. 2005; 23: 46-53. (IF: 4.405)
6. Westhoff TH, Straub-Hohenbleicher H, Schmidt S, **Tölle M**, Zidek W, van der Giet M. Abstract Convenience of ambulatory blood pressure monitoring: comparison of different devices. Blood Press Monit. 2005; 10: 239-42. (IF: 1.776)
7. Becker S, Schomburg L, Renko K, **Tölle M**, van der Giet M, Tietge UJF. Altered apolipoprotein A-V expression during the acute phase response is independent of plasma triglyceride levels in mice and humans. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Nov 2 (IF: 2,905).

Übersichtsarbeiten/Editorials

1. van der Giet M, Giebing G, **Tölle M**, Schmidt S. The Role of P2Y Receptors in the Control of Blood Pressure. Drug News Perspect 2002;15:640-6
2. van der Giet M, **Tölle M**. Why HDL cholesterol is "good cholesterol". European Journal of Clinical Investigation. 2004; 34: 247-248. (IF: 2.255)

Abstrakts

1. van der Giet M, Oppong I, **Tölle M**, Wehland M, Kossmehl, Peters J, Tepel M, Kreutz M. Die pharmakologische Vasozeptidaseinhibitoren verbessert im Gegensatz zur ACE-Inhibition die endotheliale Dysfunktion bei MWF-Ratten mit Albuminurie und Hypertonie. Nieren und Hochdruckkrankheiten. 2002; 31: 405.
2. van der Giet S, **Tölle M**, Zidek W, Tepel M, van der Giet M. Quinaprilat reduziert die Aktivierbarkeit der vaskulären NAD(P)H-Oxidase. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 2002; 127: S5 – S33.
3. **Tölle M**, van der Giet M, Tepel M, Zidek W. N-acetylcysteine partly reduced the Ang II-induced vasoconstriction in rat aorta. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 2002; 127: S5 – S33.
4. **Tölle M**, Nofer JR, Levkau B, Assmann G, Zidek W, van der Giet M. Activation of eNOS by HDL is mediated via endothelial differentiation gene receptor 3. Journal of Hypertension: 2003; 21 (Suppl 4). S211.
5. **Tölle M**, van der Giet S, Tepel M, Zidek W, van der Giet M. Quinaprilat reduces Angiotensin II-induced vasoconstriction via blockade of NADPH-oxidase. Journal of Hypertension. 2003; 21 (Suppl 4): S40.
6. van der Giet S, **Tölle M**, Tepel M, Zidek W, van der Giet M. Vascular NADPH oxidase activation is decreased by quinaprilat. Nephrology, Dialysis and Transplantation. 2003; 18 (Suppl 4). 300.
7. **Tölle M**, Tepel M, Zidek W, van der Giet M. Angiotensin II-induced vasoconstriction can be partly reduced by N-acetylcysteine. Nephrology, Dialysis and Transplantation. 2003; 18 (Suppl 4). 319.

8. Giebing G, Schmidt S, **Tölle M**, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Adenosine 4'-tetraphosphate is a potent modulator of vascular tone in the kidney. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*. 2003; 18 (Suppl 4). 572.
9. **Tölle M**, Giebing G, Schmidt S, Nofer J, Zidek W, van der Giet M. Influence of HDL of blood pressure regulation. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2003; 128 (Suppl 3). S150.
10. **Tölle M**, Giebing G, Schmidt S, Tepel M, Zidek W, van der Giet M. Ramiprilat inhibits reactive oxygen species production by inhibiting NADPH oxidase. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2003; 128 (Suppl 3). S 152.
11. **Tölle M**, Kleuser B, Schmidt S, Giebing G, Zidek W, van der Giet M. Sphingosine-1-phosphate may play an important role in vascular tone regulation. *Journal of Hypertension* 2004; 22 Suppl 2: S6.
12. **Tölle M**, Giebing G, Schmidt S, Zidek W, van der Giet M. Activation of P2Y-receptors augments angiotensin II-induced vasoconstriction. *Journal of Hypertension* 2004; 22 Suppl 2: S45.
13. Giebing G, **Tölle M**, Schmidt S, Oksche A, Zidek W, van der Giet M. Urotensin II-receptor show rapid desensitization after stimulation with urotensin II. *Journal of Hypertension*. 2004, 22. Suppl. 2; S48
14. Straub-Hohenbleicher H, **Tölle M**, Zidek W, van der Giet M. Side effects of ABPM differ between various ABPM monitors. *Journal of Hypertension*. 2004, 22. Suppl. 2; S156.
15. **Tölle M**, Kleuser B, Schmidt S, Giebing G, Zidek W, van der Giet M. S1P type 3 receptor might play an important role in vascular tone regulation. *Kidney and Blood pressure Research*. 2004; 27: 355.
16. **Tölle M**, Giebing G, Schmidt S, Zidek W, van der Giet M. UTP and UDP modulate vascular tone by activation of rho-kinase. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2004; 27: 355.
17. **Tölle M**, Zidek W, van der Giet M. S1P3-receptor may play a role in blood pressure regulation and control of endothelial function. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2004; 129 (Suppl 3): S168.
18. **Tölle M**, Zidek W, van der Giet M. Angiotensin II-induced vasoconstriction can be affected by coactivation of P2Y-receptors. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2004; 129 (Suppl 3): S168.
19. Giebing G, **Tölle M**, Zidek W, van der Giet M. Urotensin II-receptors show rapid desensitization after stimulation with urotensin II. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2004; 129 (Suppl 3): S169.
20. Straub-Hohenbleicher H, **Tölle M**, Zidek W, van der Giet M. Side effects of ABPM differ between various ABPM monitors. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2004; 129 (Suppl 3): S169.
21. Giebing G, Jürgensen J, **Tölle M**, Furkert J, Beyermann M, Rosenthal W, Zidek W, van der Giet M, Oksche A. Internalisierung und Recycling des Urotensin Rezeptors der Ratte bestimmen das Ausmaß der Kontraktion an aortalen Gefäßen. *Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie*. 46. Frühjahrstagung, Mainz, 15 – 17. 3. 2005.
22. Giebing G, **Tölle M**, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. The recently identified endothelial derived constrictive factor Uridine Adenosine Tetraphosphate acts via P2X and P2Y receptors. 15. European Meeting on Hypertension. Mailand, 17 – 21. Juni 2005.
23. **Tölle M**, Giebing G, Zidek W, van der Giet M. Activation of P2Y-receptors increase angiotensin II-induced vasoconstriction. 15. European Meeting on Hypertension. Mailand, 17 – 21. Juni 2005.

Wissenschaftliche Vorträge

1. **Tölle M**, van der Giet M, Zidek W, Tepel M. Norepinephrine-induced vasoconstriction is partially mediated by NAD(P)H oxidase-dependent superoxid production. 31. Rostocker Gespräch über kardio-vaskuläre Funktion und Hypertonie, Rostock 2002 (10 min + 5 min).
2. **Tölle M**, Zidek W, Tepel M, van der Giet M. N-Acetylcystein partly reduced the Angiotensin II-induced vasoconstriction in rat aorta. 26. Wissenschaftlicher Kongress der deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V. Hypertonie Gesellschaft, 2002 Dresden. (8 min + 2 min).
3. **Tölle M**, Nofer JR, Levkau B, Assmann G, Zidek W, van der Giet M. Activation of eNOS by HDL is mediated via endothelial differentiation gene receptor 3. 13. European Meeting on Hypertension. Mailand/Italien. 13. – 17. Juni 2003 (10 min + 5 min).
4. **Tölle M**, Giebing G, Schmidt S, Tepel M, Zidek W, van der Giet M. Ramiprilat inhibits reactive oxygene species production by inhibiting NADPH oxidase. 27. Wissenschaftlicher Kongress der deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V. Hypertonie Gesellschaft, 2003 Bonn. (7 min + 3 min).
5. **Tölle M**, Giebing G, Schmidt S, Nofer J, Zidek W, van der Giet M. Influence of HDL on blood pressure regulation. 27. Wissenschaftlicher Kongress der deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V. Hypertonie Gesellschaft, 2003 Bonn. (7 min + 3 min).
6. **Tölle M**, Kleuser B, Schmidt S, Giebing G, Zidek W, van der Giet M. Sphingosine-1-phosphate may play an important role in vascular tone regulation. 14. European Meeting on Hypertension. Paris/Frankreich. 13 – 17. Juni 2004 (10 min + 5 min).
7. **Tölle M**, Giebing G, , Zidek W, van der Giet M. Urotensin II-receptors show rapid desensitization after stimulation with urotensin II. 28. Wissenschaftlicher Kongress der deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V. Hypertonie Gesellschaft, 2004 Hannover. (5 min + 3 min).
8. **Tölle M**, Giebing G, Levkau B, Zidek W, van der Giet M. FTY720: more than immunomodulation, eNOS activation via endothelial S1P3 receptor. 15. European Meeting on Hypertension. Mailand, 17 – 21. Juni 2005 (10 min + 5 min).
9. **Tölle M**, Levkau B, Giebing G, Zidek W, van der Giet M. The immunomodulator FTY720 shows beneficial effects in endothelial cells via activating eNOS. 36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Saarbrücken, 17-20. September 2005. (7 min. + 3 min.)
10. **Tölle M**, Giebing G, Zidek W, van der Giet M. Diguanosinepentaphosphate increase Angiotensin II-induced vasoconstriction. 36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Saarbrücken, 17-20. September 2005. (7 min. + 3 min.)
11. **Tölle M**, Levkau B, Nofer JR, Tietge UJF, Chun W, Zidek W, van der Giet M. Die Bedeutung von Lysophospholipiden auf die Thrombin induzierte Monocyte chemoattractant protein 1 Sekretion. Deutsche Hochdruckliga. Berlin, 23-25. November 2005 (8 min. + 3 min.)

Förderungen, Stipendien und Preise:

- 01/2005: Interne Förderung durch die Charite Berlin – **6840 €**
- 06/2005: Travel grant der European Society of Hypertension – **570 €**
- 09/2005: Forschungsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie – **25000 €**
- 10/2005: „Isoliert perfundierte Mausniere“ durch Sonnenfeld-Stiftung – **12890,50 €**
- 11/2005: Young investigator award – Deutsche Hochdruckliga – **250 €**
- 01/2006: Novartis Stipendium für therapeutische Forschung – **8000 €**
- 06/2006: Travel grant der European Society of Hypertension – **570 €**

Anhang 3: Abbildungen

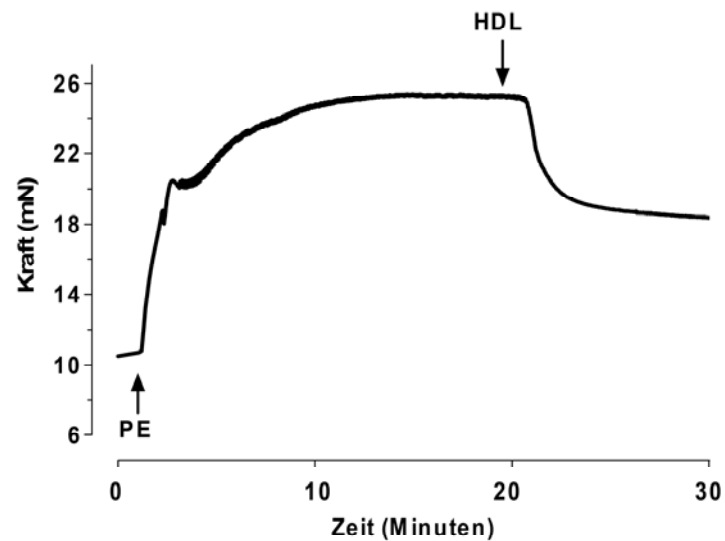


Abbildung 1: HDL induzierte Vasorelaxation an einer isolierten thorakalen Aorta

Repräsentative Originalabbildung einer HDL-induzierten Vasodilatation (0.1 mg/ml) in Phenylephrin (PE, 1 μ mol/l) vokontrahierten Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

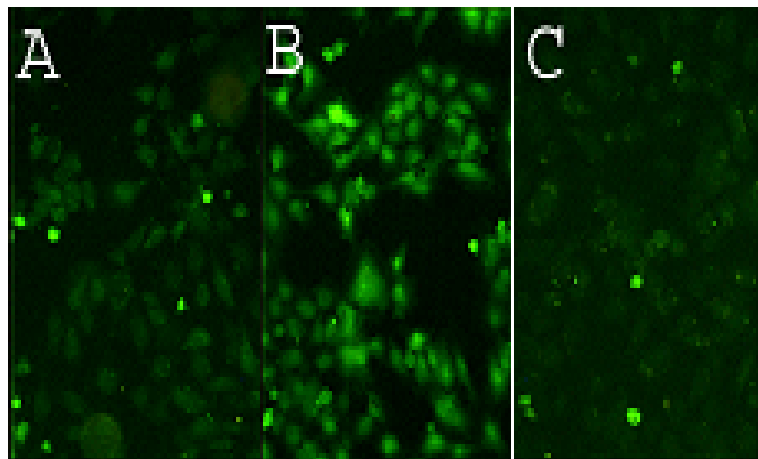


Abbildung 2: HDL induziert NO-Produktion in HUVECs

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der NO-Bildung durch HDL (0,5 mg/ml) in humanen venösen umbilikalen Endothelzellen (HUVECs) mit Hilfe des NO spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA (10 μ mol/l). A: basale NO-Produktion; B: HDL induzierte NO-Produktion; C: Wirkung von HDL unter Inhibition der eNOS durch L-NAME (50 μ mol/l).

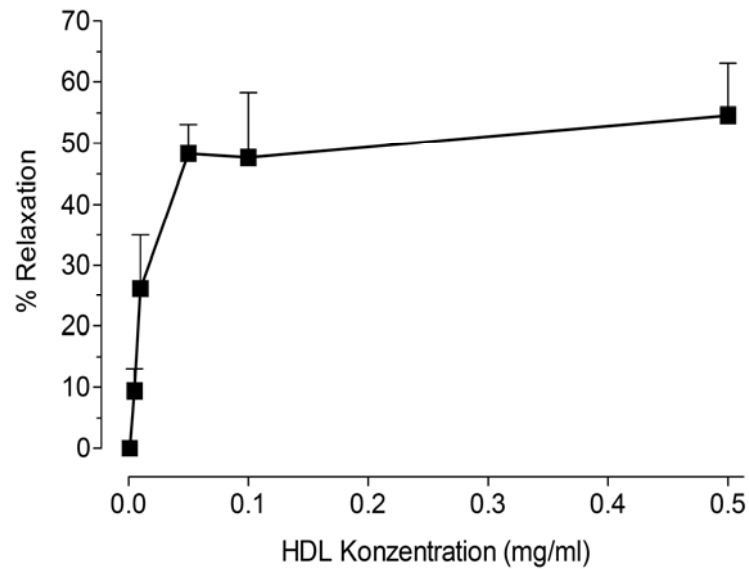


Abbildung 3: DWK der HDL induzierten Vasorelaxation an thorakalen Aortenringen

Dosis-Wirkungskurve der Vasodilatation von HDL an PE-vorcontractierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

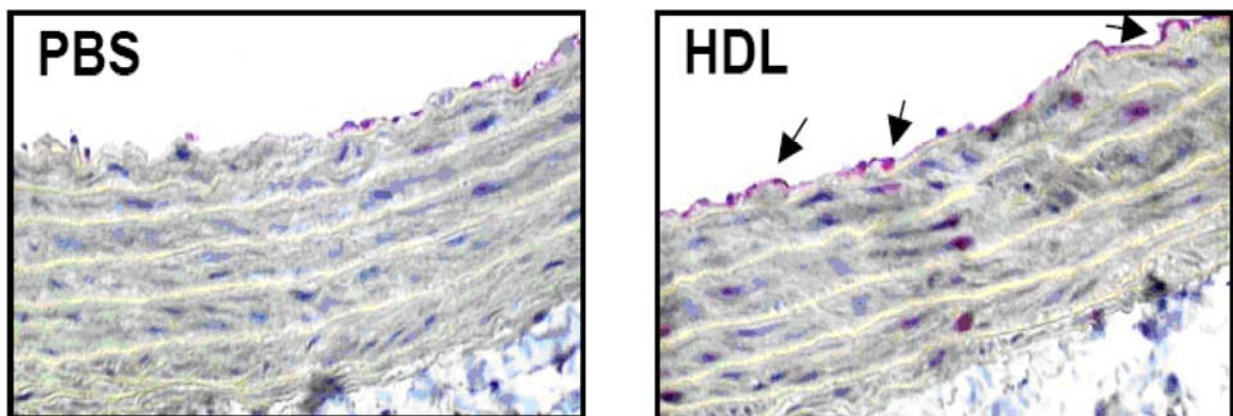


Abbildung 4: Immunhistologische Darstellung der phosphorylierten eNOS

Immunhistologische Darstellung der phosphorylierten Form der eNOS in der Endothelzellschicht von thorakalen Aorten von WKY-Ratte nach Stimulation mit HDL (Markierung mit Pfeilen).

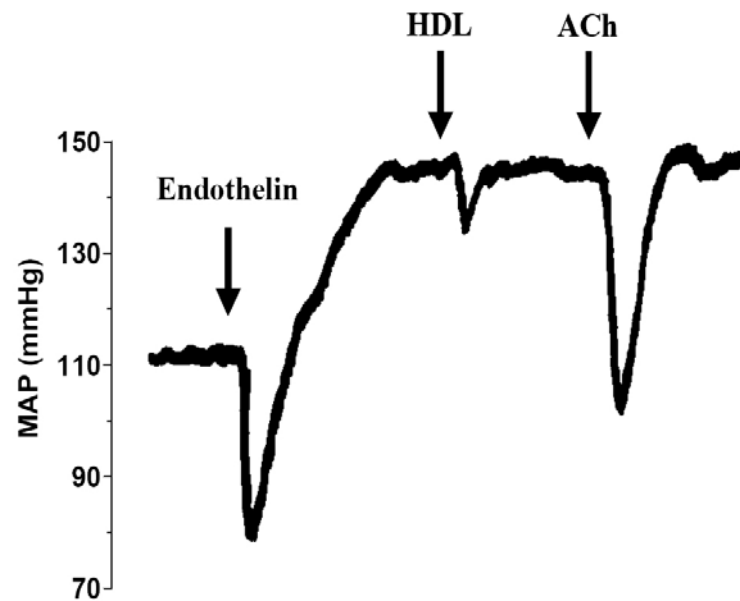


Abbildung 5: In vivo Effekt von HDL auf den systemischen Blutdruck einer WKY-Ratte

HDL (1 mg/ml) und ACh (200 nmol/l)-induzierte Erniedrigung des mittleren arteriellen Blutdrucks einer normotensiven WKY-Ratte unter Tonuserhöhung mit Endothelin.

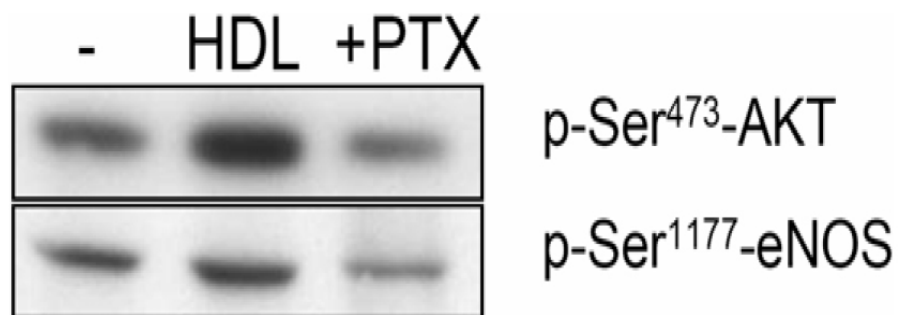


Abbildung 6: Western Blot Analyse der HDL induzierten AKT und eNOS Phosphorylierung

Westernblotanalysen der HDL (0,5 mg/ml) induzierten AKT und eNOS Phosphorylierung in HUVECs in An- und Abwesenheit von Pertussistoxin (PTX) (100 ng/ml).

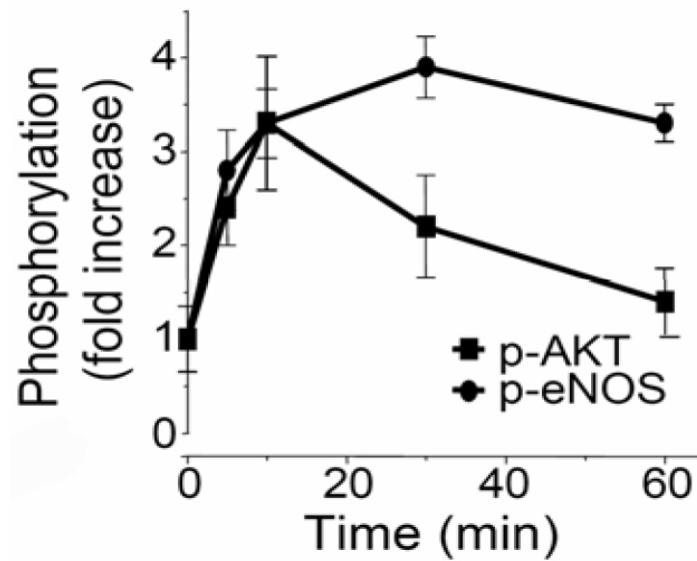


Abbildung 7: Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der AKT-Kinase und eNOS

Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von AKT und eNOS in HUVECs durch HDL mittels densitometrischen Vermessungen der Western-Blot Analysen.

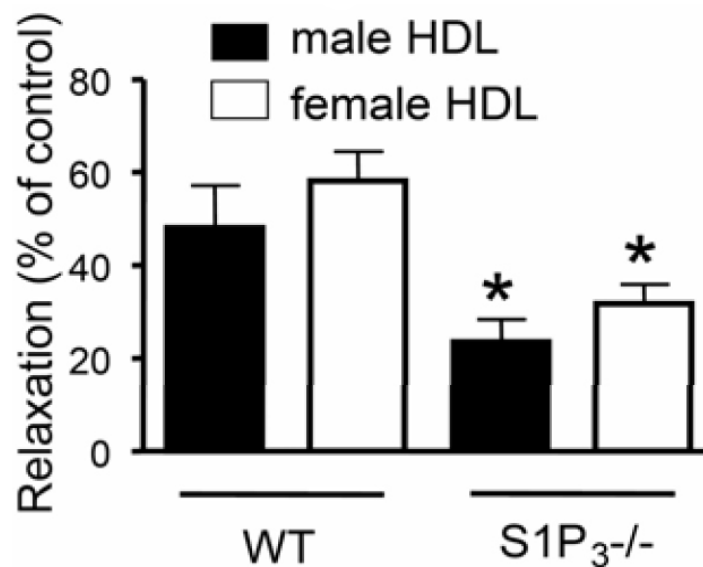


Abbildung 8: Geschlechterspezifische Unterschiede der HDL-induzierten Vasorelaxation

Einfluss von HDL (0.1 mg/ml), getrennt aus weiblichem und männlichem Plasma aufgereinigt, auf eine Dilatation in PE vorkontrahierten Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen und S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen *p<0.05 Signifikante Änderung der Dilatation bei den S1P₃-defizienten Mäusen gegenüber C57Bl/6 Mäusen.

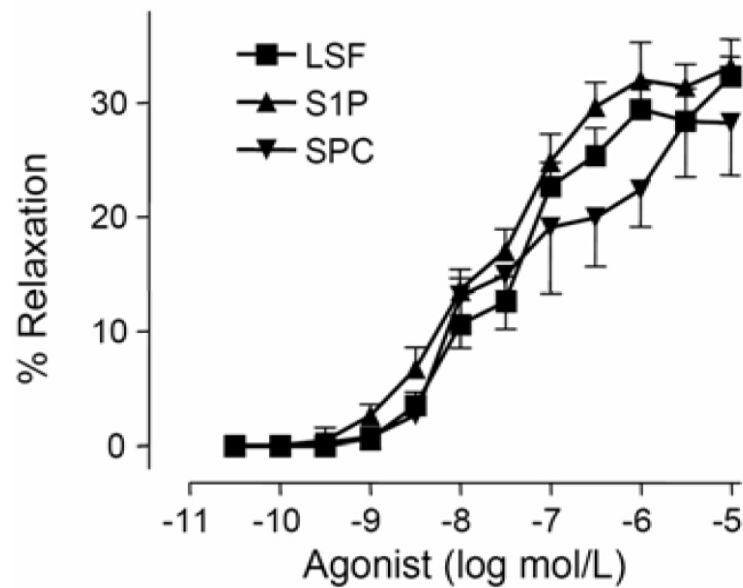


Abbildung 9: DWK der LPL induzierten Vasorelaxation an thorakalen Aortenringen

Dosis-Wirkungskurve der Vasodilatation der LPL S1P, SPC und LSF an PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

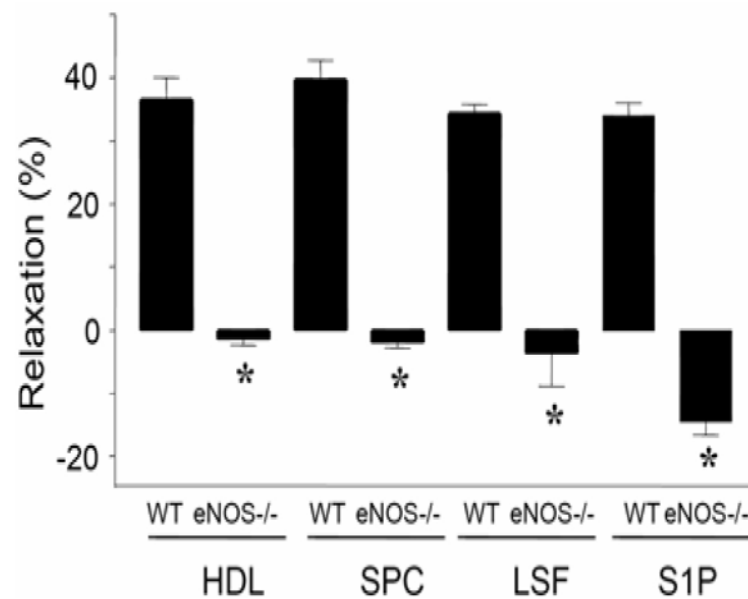


Abbildung 10: Wirkung der LPL an thorakalen Aorten von eNOS defizienten Mäusen

Darstellung der HDL (0,5 mg/ml), S1P (10 μ mol/l), SPC (10 μ mol/l) und LSF (10 μ mol/l) induzierte Vasodilatation an PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten und C57Bl/6 Mäusen. * $p < 0.05$ signifikante Veränderungen gegenüber C57Bl/6 Mäusen.

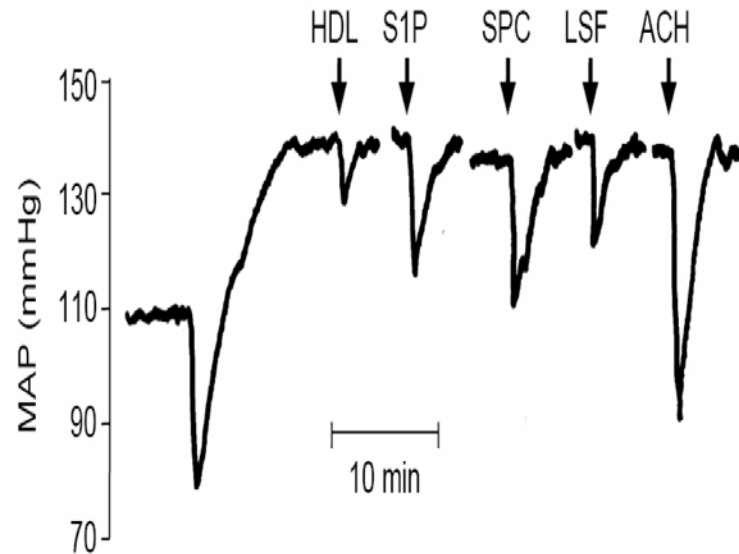


Abbildung 11: In vivo Effekt der LPL auf den systemischen Blutdruck einer WKY-Ratte

Änderung des systemischen arteriellen Mitteldrucks einer (MAP) Wistar-Kyoto-Ratte nach Erhöhung des Blutdrucks durch intravenösen Applikation von Endothelin nach Bolusapplikation von S1P (200 nmol), SPC (200 nmol), LSF (200 nmol) und HDL (1 mg).

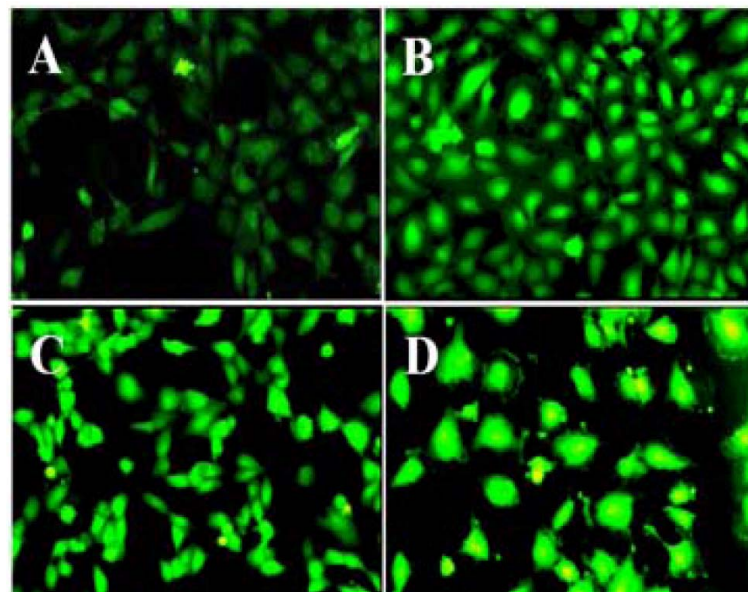


Abbildung 12: LPL induziert NO-Produktion in HUVECs

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der NO-Bildung durch S1P (10 μmol/l), SPC (10 μmol/l) und LSF (10 μmol/l) in humanen venösen umbilikalen Endothelzellen mit Hilfe des NO spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA (10 μmol/l).

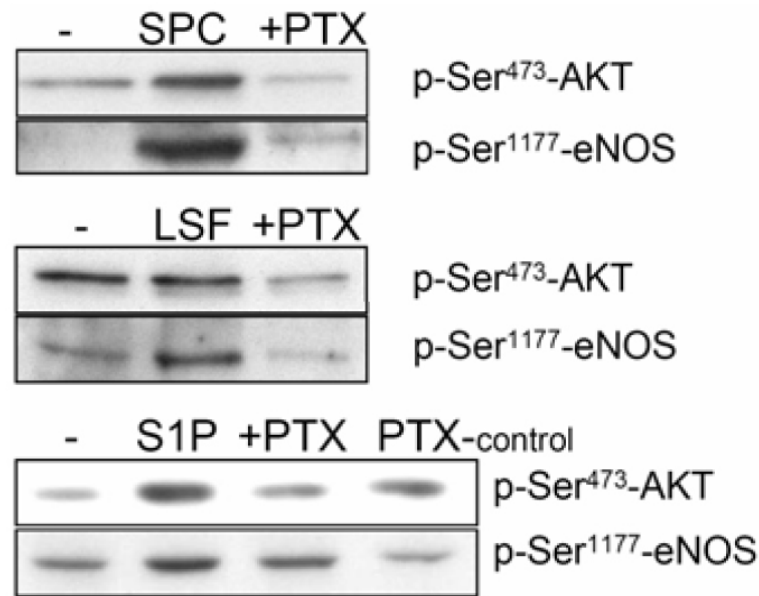


Abbildung 13: Western Blot Analyse der LPL induzierten AKT und eNOS Phosphorylierung
 Westernblotanalysen der S1P (10 μ mol/l), SPC (10 μ mol/l), bzw. LSF (10 μ mol/l) induzierten AKT und eNOS-Phosphorylierung, exemplarisch in Anwesenheit von Pertussistoxin (PTX) (100 ng/ml) für S1P dargestellt.

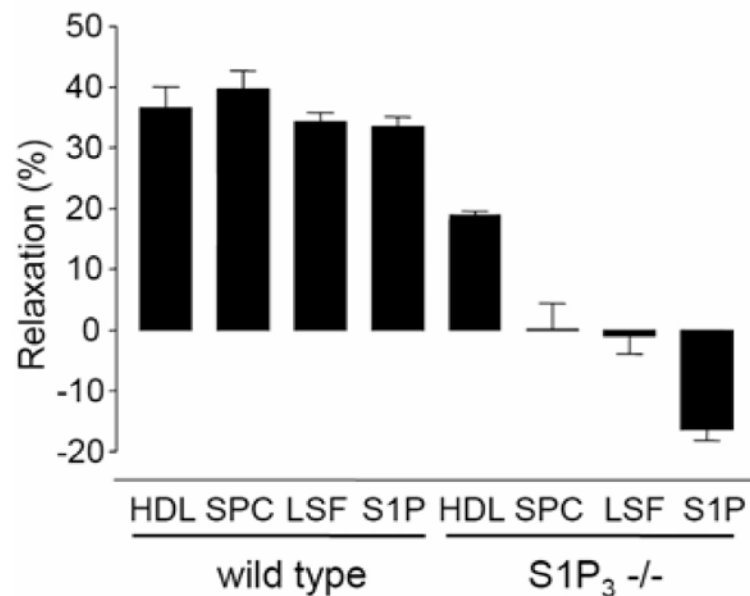


Abbildung 14: Wirkung von LPL auf thorakale Aorten von S1P₃ defizienten Mäusen
 Darstellung der HDL (0,5 mg/ml), S1P (10 μ mol/l), SPC (10 μ mol/l) und LSF (10 μ mol/l) induzierte Vasodilatation in präkontrahierten Aortenringen von S1P₃ defizienten und korrespondierenden Wildtypmäusen (WT).

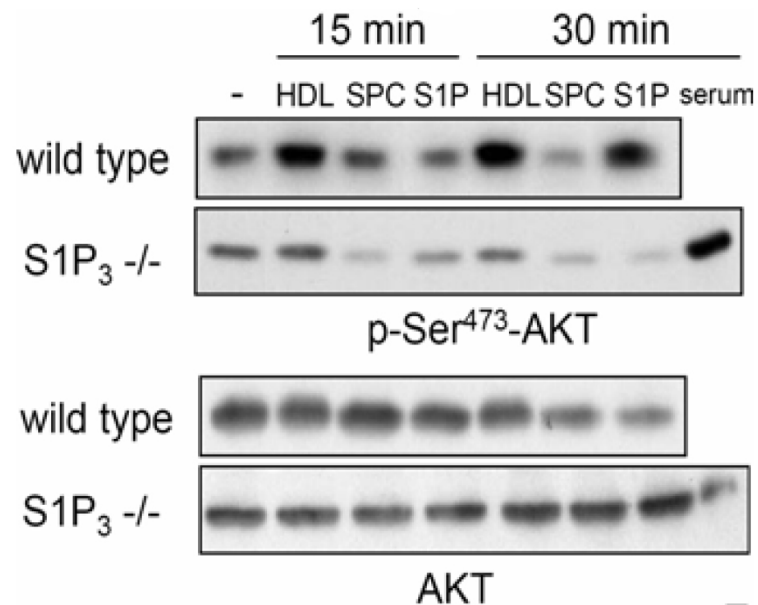


Abbildung 15: HDL und LPL induzierte AKT Phosphorylierung in S1P3 defizienten MHEC
 Westernblotanalysen der zeitabhängigen Induktion der AKT-Phosphorylierung durch HDL (1 mg/ml), S1P (10 μ mol/l) und SPC (10 μ mol/l) an isolierten Endothelzellen aus C57Bl/6 Mäusen und S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen.

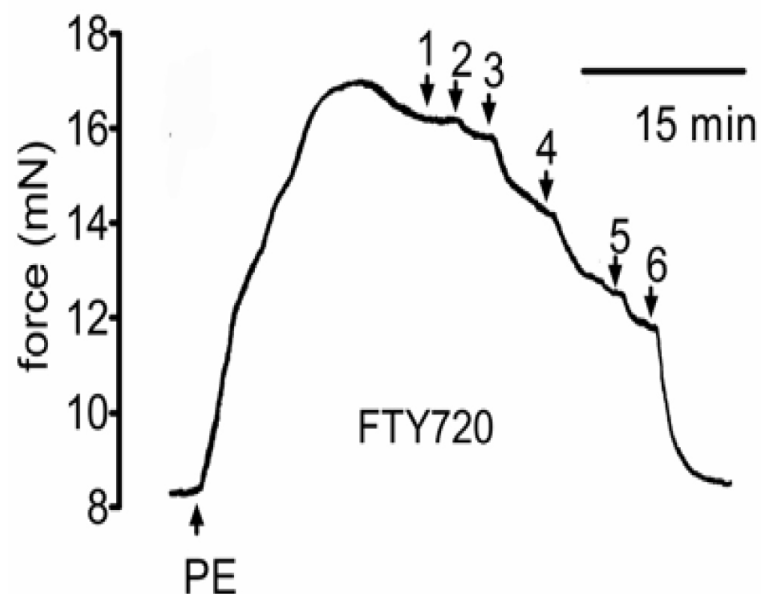


Abbildung 16: Wirkung von FTY720 auf thorakale Aorten von C57Bl/6 Mäusen

Originalabbildung der dosisabhängigen Vasodilatation von FTY720 in PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen (1: 1 nmol/l FTY720; 2: 10 nmol/l FTY720; 3: 100 nmol/l FTY720; 4: 1 μ mol/l FTY720; 5: 10 μ mol/l FTY720; 6: 10 μ mol/l ACh).

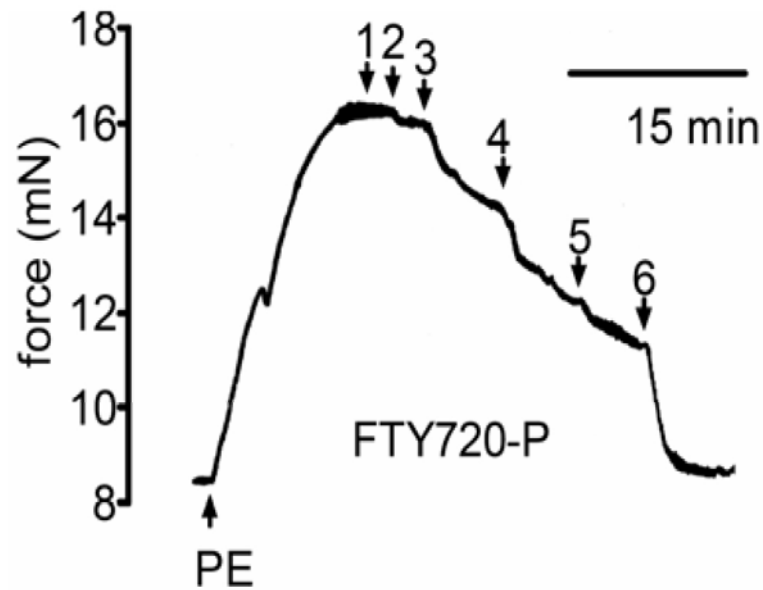


Abbildung 17: Wirkung von FTY720-P auf thorakale Aorten von C57Bl/6 Mäusen

Originalabbildung der dosisabhängigen Vasodilatation von FTY720-P an PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen (1: 1 nmol/l FTY720; 2: 10 nmol/l FTY720; 3: 100 nmol/l FTY720; 4: 1 µmol/l FTY720; 5: 10 µmol/l FTY720; 6: 10 µmol/l ACh).

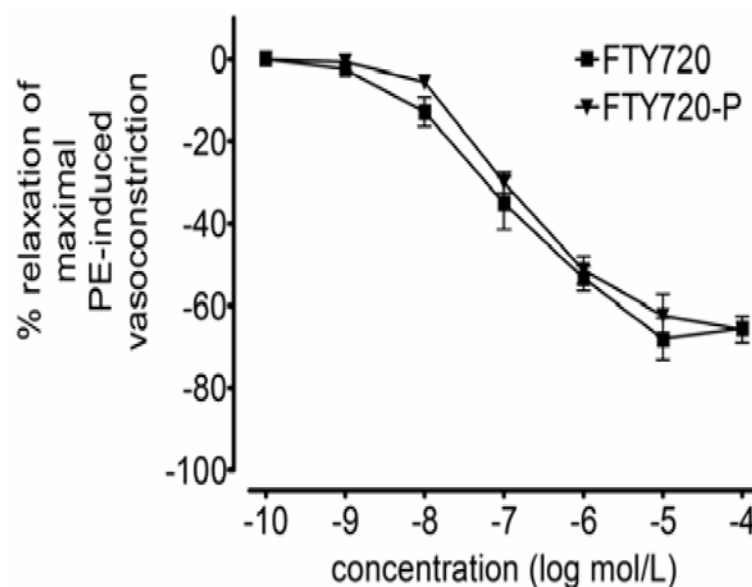


Abbildung 18: DWK von FTY720 und FTY720-P an thorakalen Aorten von C57Bl/6 Mäusen

Dosis-Wirkungskurve der Vasodilatation von FTY720 und FTY720-P an PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

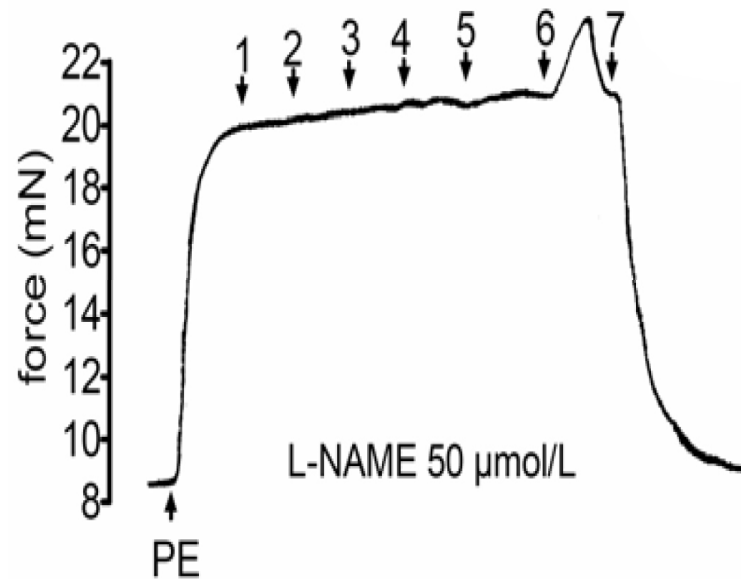


Abbildung 19: Wirkung von FTY720 unter Inhibition der eNOS durch L-NAME

Originalabbildung der Wirkung von FTY720-P in PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen unter pharmakologischer Inhibition der eNOS durch L-NAME (50 µM) am Kleinge-
 fäßmyographen (1: 1 nmol/l FTY720; 2: 10 nmol/l FTY720; 3: 100 nmol/l FTY720; 4: 1 µmol/l FTY720;
 5: 10 µmol/l FTY720; 6: 10 µmol/l ACh).

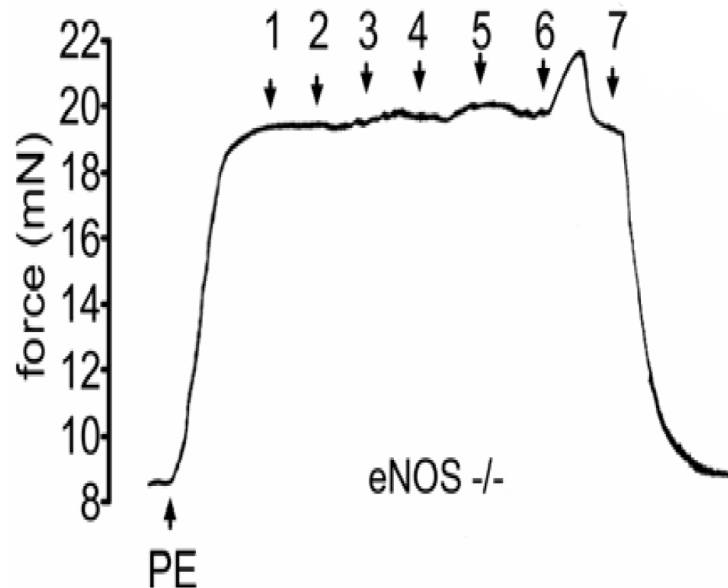


Abbildung 20: Wirkung von FTY720 an thorakalen Aorten von eNOS defizienten Mäusen

Originalabbildung der Wirkung von FTY720-P in PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von e-
 NOS defizienten Mäusen am Kleinge-
 fäßmyographen (1: 1 nmol/l FTY720; 2: 10 nmol/l FTY720; 3: 100
 nmol/l FTY720; 4: 1 µmol/l FTY720; 5: 10 µmol/l FTY720; 6: 10 µmol/l ACh).

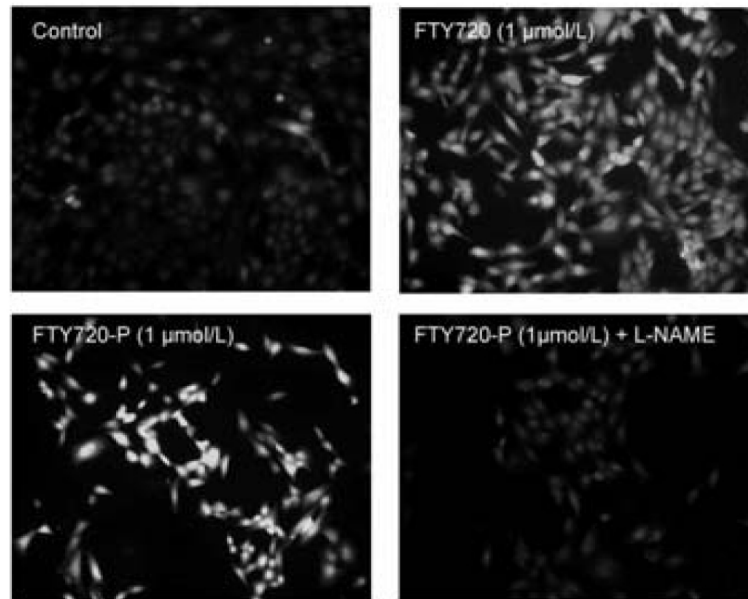


Abbildung 21: FTY720 und FTY720-P induzierte NO-Produktion in HUVECs

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der NO-Bildung durch FTY720 (10 µmol/l) und FTY720-P (10 µmol/l) in humanen venösen umbilikalen Endothelzellen mit Hilfe des NO spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs DAF-2DA (10 µmol/l).

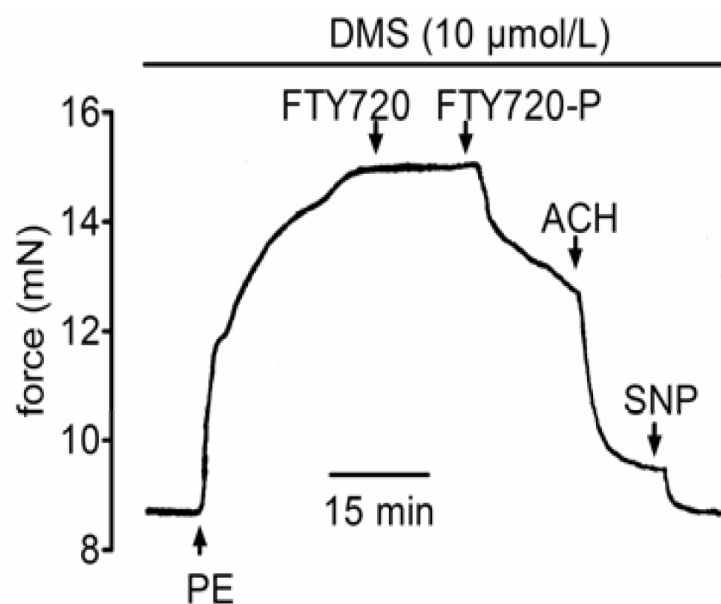


Abbildung 22: Bedeutung der Sphingosin-Kinase für die FTY720 induzierte NO Produktion

Originalabbildung der Wirkung von FTY720 (10 µmol/l) und FTY720-P (10 µmol/l) an PE-vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen unter Hemmung der Sphingosin-Kinase durch Dimethylsphingosin (DMS; 10 µM).

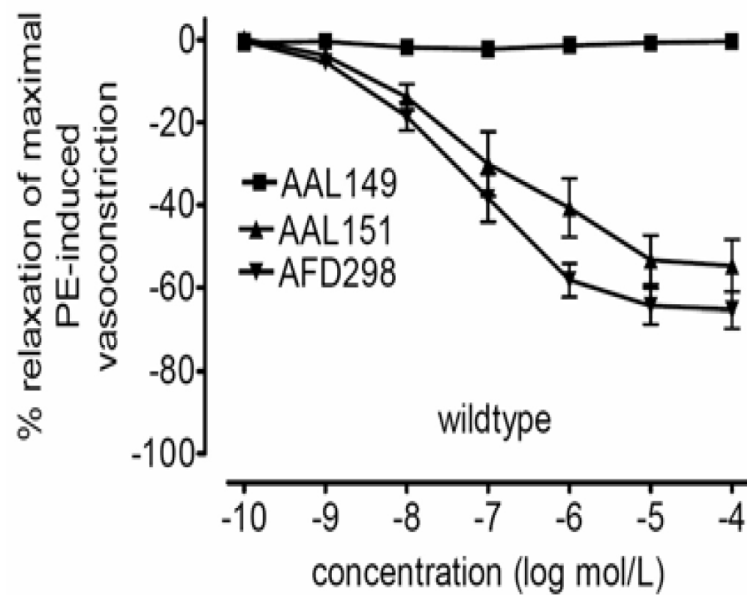


Abbildung 23: DWK der FTY720 Analoga AAL149, AAL151 und AFD298

Dosis-Wirkungskurve der Vasodilatation von AAL149, AAL151 und AFD298 in PE-vokontrahierten thorakalen Aortenringen von C57Bl/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

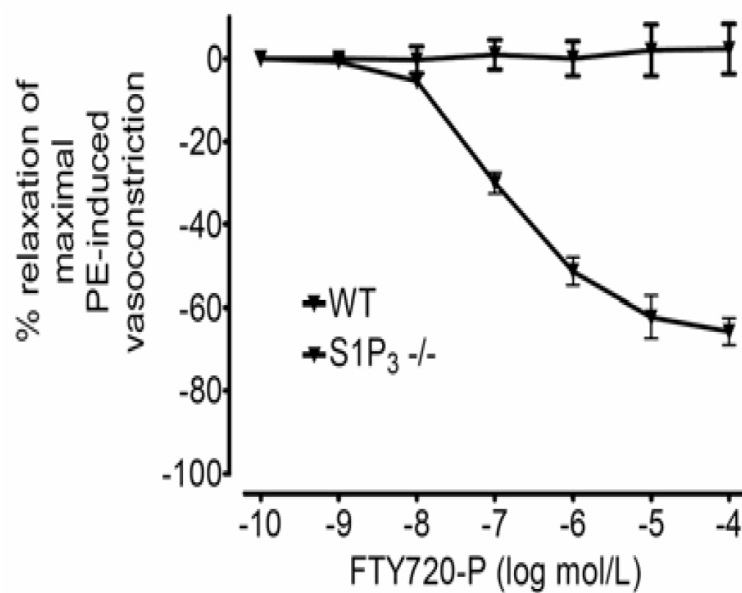


Abbildung 24: DWK von FTY720-P an thorakalen Aorten von S1P3 +/+ und -/- Mäusen

Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von FTY720-P an PE-vokontrahierten thorakalen Aortenringen von S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen.

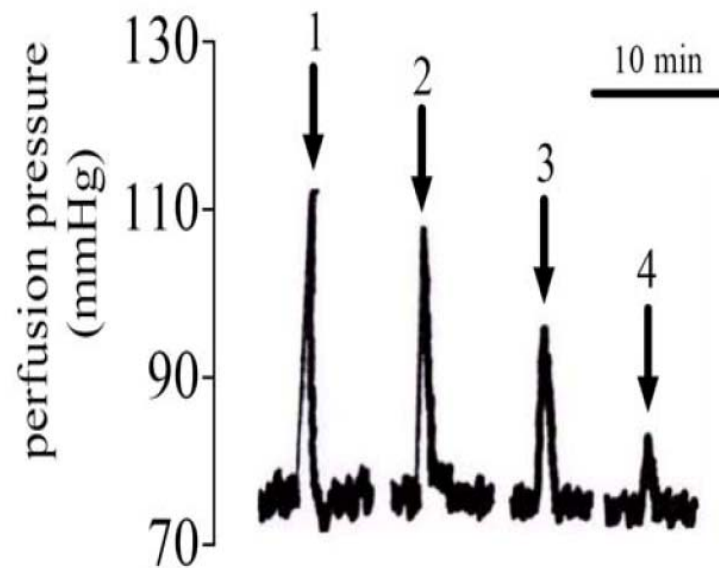


Abbildung 25: Wirkung von Endothelzellüberständen auf den renalen Perfusionsanstieg

Originalabbildung des vasoaktiven Effektes der Überstände von stimulierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMECs), welche durch mechanischen Stress stimuliert worden sind auf den Perfusionsdruck einer isoliert perfundierten Rattenniere einer WKY-Ratte.

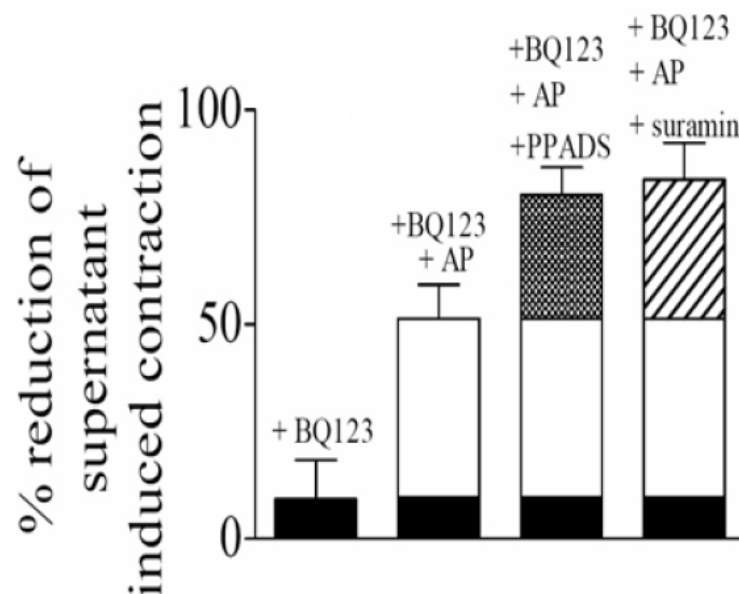


Abbildung 26: Inhibition der Vasoaktivität des EZÜ auf den renalen Perfusionsdruck

Beeinflussung des vasokonstriktiven Effektes der Endothelzellüberstände auf eine isoliert perfundierte Rattenniere einer WKY-Ratte durch die Inhibition des Endothelin-Rezeptors A (ET_A) durch BQ123 (1 $\mu\text{mol/l}$), durch alkalische Phosphatase (5 IE/ml), durch die unselektiven P2-Rezeptor-Antagonisten PPADS (10 $\mu\text{mol/l}$) und Suramin (10 $\mu\text{mol/l}$).

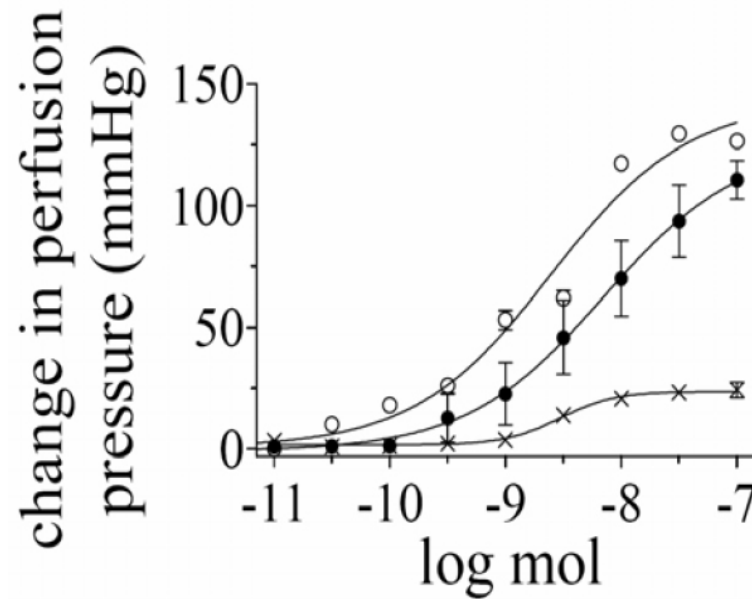


Abbildung 27: DWK von Up4A auf den renalen Perfusionsdruck

Dosis-Wirkungskurve der Veränderung des Perfusionsdrucks einer isoliert perfundierten Rattenniere einer WKY-Ratte durch Up4A (●) in Anwesenheit von $\alpha\beta$ -Methylene ATP (10 $\mu\text{mol/l}$; X) und L-NAME (50 $\mu\text{mol/l}$; ○).

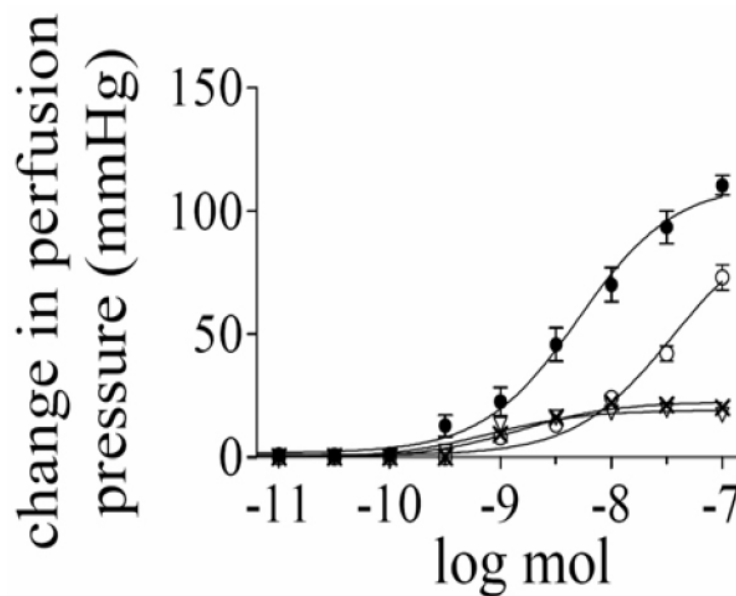


Abbildung 28: Bedeutung von P2X-Rezeptoren

Dosis-Wirkungskurve der Veränderung des Perfusionsdrucks einer isoliert perfundierten Rattenniere einer WKY-Ratte durch Up4A (●) in Anwesenheit von NFO23 (10 $\mu\text{mol/l}$; X), Ip5I (10 $\mu\text{mol/l}$, ○) und TNP-ATP (100 $\mu\text{mol/l}$; Δ).

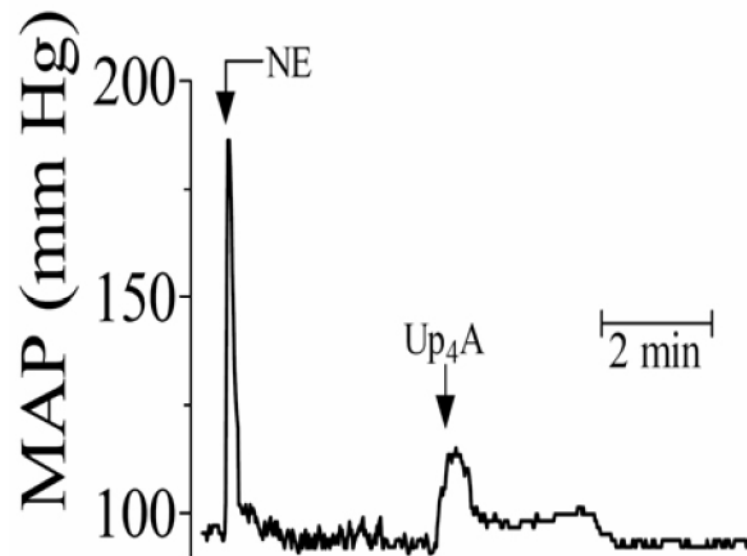


Abbildung 29: In vivo Effekt der systemischen Applikation von Up4A auf den MAD

Originalabbildung einer intraarteriellen Blutdruckmessung an einer WKY-Ratte nach Injektion von Norepinephrin (200 nmol/l) und Up4A (200 nmol/l).

Anhang 4: Literaturverzeichnis

- [1] Bombeli, T.; Mueller, M. und Haerberli, A. (1997): Anticoagulant properties of the vascular endothelium, *Thromb Haemost* (Band 77), Nr. 3, Seite 408-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9065986
- [2] Griendling, K. K. und Alexander, R. W. (1997): Oxidative stress and cardiovascular disease, *Circulation* (Band 96), Nr. 10, Seite 3264-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9396412
- [3] Gimbrone, M. A., Jr. (1995): Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis, *Am J Cardiol* (Band 75), Nr. 6, Seite 67B-70B. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7532351
- [4] Grodos, D. und Tonglet, R. (1994): Scandinavian simvastatin study (4S), *Lancet* (Band 344), Nr. 8939-8940, Seite 1768. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7997017
- [5] McMurray, J. und Slaterry, J. (1994): Scandinavian simvastatin study (4S), *Lancet* (Band 344), Nr. 8939-8940, Seite 1765-6; author reply 1767-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7997012
- [6] Gallis, B.; Corthals, G. L.; Goodlett, D. R.; Ueba, H.; Kim, F.; Presnell, S. R.; Figeys, D.; Harrison, D. G.; Berk, B. C.; Aebersold, R. und Corson, M. A. (1999): Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 42, Seite 30101-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10514497
- [7] Glomset, J. A. (1968): The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction, *J Lipid Res* (Band 9), Nr. 2, Seite 155-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4868699
- [8] Yuhanna, I. S.; Zhu, Y.; Cox, B. E.; Hahner, L. D.; Osborne-Lawrence, S.; Lu, P.; Marcel, Y. L.; Anderson, R. G.; Mendelsohn, M. E.; Hobbs, H. H. und Shaul, P. W. (2001): High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase, *Nat Med* (Band 7), Nr. 7, Seite 853-7. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11433352
- [9] Gong, M.; Wilson, M.; Kelly, T.; Su, W.; Dressman, J.; Kincer, J.; Matveev, S. V.; Guo, L.; Guerin, T.; Li, X. A.; Zhu, W.; Uittenbogaard, A. und Smart, E. J. (2003): HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner, *J Clin Invest* (Band 111), Nr. 10, Seite 1579-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12750408
- [10] Goetzl, E. J. und An, S. (1998): Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, *Faseb J* (Band 12), Nr. 15, Seite 1589-98. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9837849
- [11] Spiegel, S. und Merrill, A. H., Jr. (1996): Sphingolipid metabolism and cell growth regulation, *Faseb J* (Band 10), Nr. 12, Seite 1388-97. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8903509
- [12] Hla, T.; Lee, M. J.; Ancellin, N.; Paik, J. H. und Kluk, M. J. (2001): Lysophospholipids--receptor revelations, *Science* (Band 294), Nr. 5548, Seite 1875-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11729304
- [13] Chun, J.; Goetzl, E. J.; Hla, T.; Igarashi, Y.; Lynch, K. R.; Moolenaar, W.; Pyne, S. und Tigyi, G. (2002): International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature, *Pharmacol Rev* (Band 54), Nr. 2, Seite 265-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12037142

- [14] Mandala, S.; Hajdu, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G. J.; Card, D.; Keohane, C.; Rosenbach, M.; Hale, J.; Lynch, C. L.; Rupprecht, K.; Parsons, W. und Rosen, H. (2002): Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists, *Science* (Band 296), Nr. 5566, Seite 346-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11923495
- [15] Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L. und Cyster, J. G. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1, *Nature* (Band 427), Nr. 6972, Seite 355-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14737169
- [16] Brinkmann, V.; Pinschewer, D.; Chiba, K. und Feng, L. (2000): FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation, *Trends Pharmacol Sci* (Band 21), Nr. 2, Seite 49-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10664606
- [17] Vitko, S. und Viklicky, O. (2004): Cyclosporine renal dysfunction, *Transplant Proc* (Band 36), Nr. 2 Suppl, Seite 243S-247S. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15041346
- [18] El-Hamamsy, I.; Grant, M.; Stevens, L. M.; Malo, O.; Carrier, M. und Perrault, L. P. (2005): Cyclosporine-induced coronary endothelial dysfunction: is tetrahydrobiopterin the solution?, *Transplant Proc* (Band 37), Nr. 5, Seite 236S-240S. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15964417
- [19] Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K. und Masaki, T. (1988): A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature* (Band 332), Nr. 6163, Seite 411-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2451132
- [20] Miller, V. M. und Vanhoutte, P. M. (1985): Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase, *Am J Physiol* (Band 248), Nr. 4 Pt 2, Seite H432-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3920919

-
- [21] Cosentino, F.; Hishikawa, K.; Katusic, Z. S. und Luscher, T. F. (1997): High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells, *Circulation* (Band 96), Nr. 1, Seite 25-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9236411
- [22] Kaiser, R. A.; Oxhorn, B. C.; Andrews, G. und Buxton, I. L. (2002): Functional compartmentation of endothelial P2Y receptor signaling, *Circ Res* (Band 91), Nr. 4, Seite 292-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12193461
- [23] Johnsen, S. H.; Mathiesen, E. B.; Fosse, E.; Joakimsen, O.; Stensland-Bugge, E.; Njolstad, I. und Arnesen, E. (2005): Elevated high-density lipoprotein cholesterol levels are protective against plaque progression: a follow-up study of 1952 persons with carotid atherosclerosis the Tromso study, *Circulation* (Band 112), Nr. 4, Seite 498-504. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16027250
- [24] Schulte, H.; Cullen, P. und Assmann, G. (1999): Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Munster Heart Study (PROCAM), *Atherosclerosis* (Band 144), Nr. 1, Seite 199-209. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10381293
- [25] O'Connell, B. J. und Genest, J., Jr. (2001): High-density lipoproteins and endothelial function, *Circulation* (Band 104), Nr. 16, Seite 1978-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11602504

- [26] Spieker, L. E.; Sudano, I.; Hurlimann, D.; Lerch, P. G.; Lang, M. G.; Binggeli, C.; Corti, R.; Ruschitzka, F.; Luscher, T. F. und Noll, G. (2002): High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men, *Circulation* (Band 105), Nr. 12, Seite 1399-402. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11914243
- [27] Fleisher, L. N.; Tall, A. R.; Witte, L. D.; Miller, R. W. und Cannon, P. J. (1982): Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins, *J Biol Chem* (Band 257), Nr. 12, Seite 6653-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7045092
- [28] Dimmeler, S. und Zeiher, A. M. (1999): Nitric oxide-an endothelial cell survival factor, *Cell Death Differ* (Band 6), Nr. 10, Seite 964-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10556973
- [29] Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R. und Zeiher, A. M. (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* (Band 399), Nr. 6736, Seite 601-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10376603
- [30] Boo, Y. C.; Sorescu, G.; Boyd, N.; Shiojima, I.; Walsh, K.; Du, J. und Jo, H. (2002): Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 5, Seite 3388-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11729190
- [31] Haynes, M. P.; Sinha, D.; Russell, K. S.; Collinge, M.; Fulton, D.; Morales-Ruiz, M.; Sessa, W. C. und Bender, J. R. (2000): Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells, *Circ Res* (Band 87), Nr. 8, Seite 677-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11029403

- [32] Zachary, I. und Gliki, G. (2001): Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family, *Cardiovasc Res* (Band 49), Nr. 3, Seite 568-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11166270
- [33] Nofer, J. R.; Levkau, B.; Wolinska, I.; Junker, R.; Fobker, M.; von Eckardstein, A.; Seedorf, U. und Assmann, G. (2001): Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 37, Seite 34480-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11432865
- [34] Mineo, C.; Yuhanna, I. S.; Quon, M. J. und Shaul, P. W. (2003): High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 11, Seite 9142-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12511559
- [35] Dantas, A. P.; Igarashi, J. und Michel, T. (2003): Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (Band 284), Nr. 6, Seite H2045-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12742827
- [36] Finigan, J. H.; Dudek, S. M.; Singleton, P. A.; Chiang, E. T.; Jacobson, J. R.; Camp, S. M.; Ye, S. Q. und Garcia, J. G. (2005): Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 17, Seite 17286-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15710622
- [37] Nofer, J. R.; van der Giet, M.; Tolle, M.; Wolinska, I.; von Wnuck Lipinski, K.; Baba, H. A.; Tietge, U. J.; Godecke, A.; Ishii, I.; Kleuser, B.; Schafers, M.; Fobker, M.; Zidek, W.; Assmann, G.; Chun, J. und Levkau, B. (2004): HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3, *J Clin Invest* (Band 113), Nr. 4, Seite 569-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14966566
- [38] Fukushima, N.; Ishii, I.; Contos, J. J.; Weiner, J. A. und Chun, J. (2001): Lysophospholipid receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 41), Seite 507-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11264467

- [39] Levade, T.; Auge, N.; Veldman, R. J.; Cuvillier, O.; Negre-Salvayre, A. und Salvayre, R. (2001): Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology, *Circ Res* (Band 89), Nr. 11, Seite 957-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11717151
- [40] Yang, A. H.; Ishii, I. und Chun, J. (2002): In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice, *Biochim Biophys Acta* (Band 1582), Nr. 1-3, Seite 197-203. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12069829
- [41] Morales-Ruiz, M.; Lee, M. J.; Zollner, S.; Gratton, J. P.; Scotland, R.; Shiojima, I.; Walsh, K.; Hla, T. und Sessa, W. C. (2001): Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 22, Seite 19672-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11278592
- [42] Lee, M. J.; Thangada, S.; Claffey, K. P.; Ancellin, N.; Liu, C. H.; Kluk, M.; Volpi, M.; Sha'afi, R. I. und Hla, T. (1999): Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate, *Cell* (Band 99), Nr. 3, Seite 301-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10555146
- [43] McGiffert, C.; Contos, J. J.; Friedman, B. und Chun, J. (2002): Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis, *FEBS Lett* (Band 531), Nr. 1, Seite 103-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12401212
- [44] Zhang, G.; Contos, J. J.; Weiner, J. A.; Fukushima, N. und Chun, J. (1999): Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate, *Gene* (Band 227), Nr. 1, Seite 89-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9931453
- [45] Ishii, I.; Fukushima, N.; Ye, X. und Chun, J. (2004): Lysophospholipid receptors: signaling and biology, *Annu Rev Biochem* (Band 73), Seite 321-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15189145

- [46] Ohmori, T.; Yatomi, Y.; Osada, M.; Kazama, F.; Takafuta, T.; Ikeda, H. und Ozaki, Y. (2003): Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2, *Cardiovasc Res* (Band 58), Nr. 1, Seite 170-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12667959
- [47] Brinkmann, V. und Lynch, K. R. (2002): FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity, *Curr Opin Immunol* (Band 14), Nr. 5, Seite 569-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12183155
- [48] Aki, F. T. und Kahan, B. D. (2003): FTY720: A new kid on the block for transplant immunosuppression, *Expert Opin Biol Ther* (Band 3), Nr. 4, Seite 665-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12831371
- [49] Paugh, S. W.; Payne, S. G.; Barbour, S. E.; Milstien, S. und Spiegel, S. (2003): The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2, *FEBS Lett* (Band 554), Nr. 1-2, Seite 189-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14596938
- [50] Kharel, Y.; Lee, S.; Snyder, A. H.; Sheasley-O'Neill, S. L.; Morris, M. A.; Setiady, Y.; Zhu, R.; Zigler, M. A.; Burcin, T. L.; Ley, K.; Tung, K. S.; Engelhard, V. H.; Macdonald, T. L. und Lynch, K. R. (2005): Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720, *J Biol Chem*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16093248
- [51] Busauschina, A.; Schnuelle, P. und van der Woude, F. J. (2004): Cyclosporine nephrotoxicity, *Transplant Proc* (Band 36), Nr. 2 Suppl, Seite 229S-233S. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15041343
- [52] Hwang, M. W.; Matsumori, A.; Furukawa, Y.; Ono, K.; Okada, M.; Iwasaki, A.; Hara, M. und Sasayama, S. (1999): FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation, *Circulation* (Band 100), Nr. 12, Seite 1322-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10491378

-
- [53] Motte, S.; Communi, D.; Piroton, S. und Boeynaems, J. M. (1995): Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 27), Nr. 1, Seite 1-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7757878
- [54] Inscho, E. W.; Cook, A. K.; Mui, V. und Miller, J. (1998): Direct assessment of renal microvascular responses to P2-purinoceptor agonists, *Am J Physiol* (Band 274), Nr. 4 Pt 2, Seite F718-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9575896
- [55] Cameselle, J. C.; Costas, M. J.; Sillero, M. A. und Sillero, A. (1982): Bis-(5'-guanosyl) tetraphosphatase in rat tissues, *Biochem J* (Band 201), Nr. 2, Seite 405-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6282267